

Q-3

1010

兽医实验 检验手册

汪诚天 叶祝年 王云方 编著



上海科学技术出版社

兽医实验检验手册

汪诚天 叶祝年 王云方 编著

上海科学技术出版社

兽医实验检验手册

汪诚天 叶祝年 王云方 编著

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路 450 号)

新华书店上海发行所发行 上海中华印刷厂印刷

开本 787 × 1092 1/32 印张 17.75 插页 4 字数 552,000

1984 年 6 月第 1 版 1984 年 6 月第 1 次印刷

印数: 1—13,500

统一书号: 16119·796

定价:

3.05 元

前 言

近年来，兽医实验室检验技术发展较为迅速，实验诊断方法的改进也比较多。因此，目前兽医检疫、检验和教学部门渴望能有这方面的工具书出版。《兽医实验检验手册》一书即是为满足这方面的需要而编写的。

全书共四篇四十六章，书末为附录。第一篇为细菌学和免疫学检验技术，主要叙述近年来细菌学和免疫学新发展的应用技术。除推荐七十余种常用培养基配制、染液配制和染色法外，对直接和间接凝集反应试验、定量和定性沉淀反应试验、琼脂扩散试验、免疫电泳检验、荧光抗体和酶标记检验技术，都作了详细介绍。第二篇为病原细菌学检验技术，介绍主要家畜传染病病原菌的实验室确诊方法和常见传染病的细菌学检验技术。第三篇为病毒学检验的常用技术和主要病毒性疾病的实验室诊断方法，为从事兽医病毒性疾病检验者提供技术资料。第四篇阐述兽医寄生虫学检验的常用技术。附录简述寄生虫标本的制作和保存方法，以及附有家畜的各种蠕虫卵图。书中附插图 101 幅。

本书检验技术资料丰富，内容翔实，不失为兽医动物及其产品检疫、卫生检验人员的一本实用参考书，也是农业院校兽医专业和兽医卫生专业师生的教学参考书。但由于我们的业务水平有限，书中不免有不妥之处，敬请读者提出宝贵意见和指正。

在编写过程中，承 |蔡无忌|教授和李溟教授指导，朱广发同志提供荧光抗体检验资料，郑思民同志审阅寄生虫病检验等方面的内容，谨致以衷心的感谢。

编著者

目 录

第一篇 细菌学和免疫学检验技术

第一章 染色标本制作	2
第一节 标本的制作步骤	2
一、标本的制作	2
二、标本的干燥	3
三、标本的固定	3
四、组织切片染色标本的处理	3
第二节 染液的配制	4
第三节 常用染液染色法	5
一、吕氏(Löffler's)亚甲蓝染色法	5
二、多色性亚甲蓝染色法	6
三、革兰氏染色法	6
四、结核杆菌及其他抗酸性杆菌染色	8
五、芽胞染色	9
六、荚膜染色	10
七、鞭毛染色	10
八、罗曼诺斯基氏染色剂	12
九、螺旋体染色	14
十、病毒包涵体和原始小体染色	15
第二章 培养基制作技术	17
第一节 常用玻皿处理	17
第二节 微生物学灭菌技术	18
一、湿热灭菌法	18
二、干热灭菌法	20
三、其他物理灭菌法	20
四、过滤除菌法	20

第三节 培养基及其制作	23
一、培养基制作法	23
二、常用培养基的配制	30
第三章 细菌的分离培养和鉴定技术	65
第一节 分离培养法	65
一、斜面培养基接种	65
二、液体培养基接种	66
三、半固体培养基穿刺接种	67
四、平板划线分离	67
五、平板倾注培养	68
六、厌氧培养法	69
七、二氧化碳培养法	71
八、特殊培养基分离法	71
第二节 动物试验法	72
一、试验用器械	72
二、接种材料	75
三、接种动物及接种试验方法	75
四、试验动物的观察	79
五、试验动物尸体剖检	80
第三节 细菌鉴定的生化试验	81
一、糖类发酵试验	81
二、糖类代谢型试验	81
三、胺基质试验	82
四、甲基红试验	82
五、V-P 试验	83
六、枸橼酸盐利用试验	83
七、硫化氢产生试验	83
八、硝酸盐还原试验	83
九、尿素分解试验	84
十、淀粉水解试验	84
十一、脂肪水解试验	84
十二、氧化酶试验	84
十三、过氧化氢酶试验	85
十四、细胞色素氧化酶试验	85
十五、凝固酶试验	85

十六、链球菌激活酶试验	86
十七、卵磷脂酶试验	86
十八、脱氧核糖核酸酶试验	87
十九、赖氨酸脱羧酶试验	87
二十、苯丙氨酸脱氢酶试验	87
二十一、丙二酸盐利用试验	88
二十二、丙二酸盐利用和苯丙氨酸脱氢酶联合试验	88
二十三、半乳糖二酸盐利用试验	88
二十四、 β -半乳糖苷酶试验	88
二十五、胆汁抑菌试验	89
二十六、胆汁溶菌试验	89
二十七、染料抑菌试验	90
二十八、溶纤维素试验	90
二十九、溶血试验	91
第四节 菌种保存	91
一、斜面培养基保存法	91
二、半固体保存法	92
三、冷冻干燥保存法	92
四、简易真空干燥法(Rayner 氏法)	92
五、干燥器干燥菌种法	93
六、低温保存法	93
第四章 免疫学检验技术	94
第一节 凝集反应试验	94
一、定性凝集试验	95
二、定量凝集试验	96
三、惰性载体凝集	97
第二节 沉淀反应试验	104
一、定性沉淀试验	104
二、定量沉淀试验	108
第三节 免疫电泳技术	110
一、微量琼脂免疫电泳技术	110
二、电免疫扩散(火箭免疫电泳)技术	114
三、对流免疫电泳技术	115
四、双相免疫电泳	115
五、醋酸纤维膜免疫电泳技术	116

六、醋酸纤维素-琼脂免疫电泳技术	117
第四节 补体结合试验	118
一、试验准备工作	119
二、各种成分的效价滴定法	121
三、试验工作的进行	125
第五节 标记免疫反应试验	131
一、荧光抗体技术	131
二、免疫过氧化酶程序技术	147
三、放射免疫测定概况	152

第二篇 病原细菌学检验技术

第五章 葡萄球菌属的检验	156
第六章 链球菌属的检验	160
第七章 假单胞菌属的检验	170
第八章 大肠杆菌属的检验	173
第九章 沙门氏杆菌属的检验	184
第十章 布氏杆菌属的检验	205
第十一章 巴氏杆菌属的检验	218
第十二章 鼻疽杆菌属的检验	228
第十三章 放线杆菌属的检验	231
第十四章 猪丹毒杆菌的检验	233
第十五章 李氏杆菌属的检验	237
第十六章 分枝杆菌属的检验	240
第十七章 嗜血杆菌属的检验	253
第十八章 棒状杆菌属的检验	257
第十九章 放线杆菌属的检验	261
第二十章 弧菌属的检验	264
第二十一章 需氧芽胞杆菌属的检验	270
第二十二章 梭状芽胞杆菌属的检验	279
第一节 破伤风梭菌的检验	280
第二节 气肿疽梭菌的检验	282
第三节 腐败梭菌的检验	283
第四节 魏氏梭菌的检验	285

第五节 诺维氏梭菌(水肿梭菌)的检验	287
第六节 溶血梭菌的检验	288
第七节 肉毒梭菌的检验	289
第二十三章 枝原体的检验	292
第二十四章 钩端螺旋体的检验	298
第二十五章 致病性真菌的检验	304

第三篇 病毒学检验技术

第二十六章 病毒病实验诊断基本技术	314
第一节 病毒检验室需用的一般设备和用具	314
第二节 玻璃器皿的洗涤和消毒	316
第三节 病毒检验室常用溶液的配制	318
第四节 有关组织培养的一些溶液的配制	320
第五节 检样的采取和处理	329
第六节 关于病毒性疾病的常用实验诊断法	331
第七节 半数致死量的测定	334
第八节 鸡胚培养	339
第九节 组织培养	344
第二十七章 猪瘟的检验	350
一、荧光抗体检查法	350
二、反向间接血凝试验	351
三、琼脂扩散试验	354
四、猪体免疫试验	354
五、兔体交互免疫试验	355
六、新城疫病毒强化试验	355
七、白细胞计数	358
八、胰蛋白酶试验	358
第二十八章 口蹄疫和猪水疱病的检验	357
第一节 口蹄疫病毒的实验诊断	357
一、乳鼠保护试验	357
二、豚鼠接种试验	358
三、补体结合试验	359
四、琼脂扩散试验	362
五、荧光抗体检查法	362

六、反向间接血凝	363
第二节 猪水疱病病毒的实验诊断	364
一、乳鼠保护试验	364
二、其他方法	365
第二十九章 流行性感胃的检验	366
第三十章 痘病的检验	373
第三十一章 狂犬病的检验	381
第三十二章 鸡新城疫的检验	385
第三十三章 鸡马立克氏病的检验	389
第三十四章 马传染性贫血病的检验	392
第三十五章 伪狂犬病的检验	406
第三十六章 鸡传染性喉头气管炎的检验	408
第三十七章 猪传染性胃肠炎的检验	411
第三十八章 猪乙型脑炎的检验	415

第四篇 家畜寄生虫学检验技术

第三十九章 粪便检查法	434
一、粪便样品的采集	484
二、肉眼检查法	484
三、虫卵、幼虫、原虫的检查	485
四、粪便中寄生虫的鉴定	462
第四十章 活体组织虫卵检查法	473
一、直肠粘膜血吸虫卵检查法	473
二、活体组织内血吸虫卵死活鉴定法	474
第四十一章 血液寄生虫检查法	480
一、厚血膜检查法	482
二、薄血膜检查法	482
三、微丝蚴浓集检查法	483
四、几种常用的血膜染色法及染液的配制	484
第四十二章 生殖器寄生虫检查法	489
一、生殖器粘液直接涂片检查法	490
二、生殖器粘液洗涤检查法	490
三、悬滴检查法	490

四、涂片染色检查法	490
五、培养检查法	492
第四十三章 其他器官排泄物和分泌物检查法	495
一、尿液检查法	495
二、气管和鼻腔分泌物检查法	495
三、禽类气管内容物检查法	496
第四十四章 免疫学和血清学检查	497
一、皮内试验	497
二、耕牛血吸虫病环卵沉淀试验	500
三、间接红细胞凝集试验	504
四、聚苯乙烯乳胶凝集试验	510
五、弓形虫病染料试验	511
六、免疫荧光法	514
七、酶联免疫吸附试验	518
第四十五章 皮肤寄生虫检查法	521
一、家畜癣的检查法	521
二、婢和吸血昆虫检查法	528
三、丝虫类检查法	528
四、体外寄生节肢动物的鉴别	526
第四十六章 解剖检查法	527
一、斯克里亚平系统蠕虫学剖检法	531
二、禽类蠕虫学剖检法	532
三、动物血吸虫血管灌洗集虫法	533
附录	537
一、寄生虫标本的制作和保存	537
二、家畜的各种蠕虫卵	550

第 一 篇

细菌学和免疫学检验技术

第一章

染色标本制作

细菌的染色不仅使细菌在显微镜下容易见到，而且对各种细菌的鉴别也有重要意义。但要得到良好的染色标本，必须正确掌握染色标本的制作技术。

第一节 标本的制作步骤

常用的细菌固体标本有三种：细菌涂片、血片和组织触片。制片的目的是检查有无细菌存在，是何种形态的细菌。细菌涂片适用对细菌培养物（包括固体和液体培养基上的细菌培养物）的形态观察；血片常用于病畜生前或死后剖检时检查其血液中是否存在细菌；组织触片常适用于死亡家禽家畜的组织器官的细菌检查。三种固定标本片，除制片方法上有所不同，其余的检查步骤是一致的。从制片到显微镜检查（简称“镜检”）常须经过下列几个步骤。

一、标本的制作

1. 细菌涂片的制作 取一载玻片，将铂耳经火焰灭菌后，取1~2铂耳的无菌生理盐水或蒸馏水，放在玻片中央（一般一玻片可作2~3个涂面）。再将铂耳灭菌，从固体培养基上挑取细菌少许，和玻片上水点混匀（可先在水点边缘将细菌磨匀，再扩到整个水滴磨匀）使其成为直径约1厘米大小的涂面。涂面要求薄而匀。若是液体培养物，则不需要预先在玻片上加水，可直接将火焰灭菌的铂耳，伸入培养管中挑取1~2铂耳的液体培养物，放在玻片上，涂成均匀的涂面即可。

2. 血片的制作 取一边缘齐整的玻片，用其一端，蘸血液少许，在另一玻片上，以45°角度均匀地推成一条薄的血涂面。

3. 组织触片制作 当尸体以无菌手术打开胸腹腔后，用经火焰灭菌

的镊子镊起组织(如肝、脾、淋巴、肾等)一端,然后用灭菌的剪刀剪下组织一小块,将组织块的切面垂直地在玻片上轻压一下,使留下一个组织切面的压迹(每张玻片上可作2~3个压迹)。也可将组织用镊子夹住,以切面在玻片上以一个方向作一涂层。

二、标本的干燥

标本涂好后,原则上应让其自然干燥,有时因天冷,标本不易干燥,可将标本面向上,小心地置于火焰的高处,略烘干燥。但切不可紧靠火焰,以致涂片上的材料烤枯变形。所以在一般情况下,以自然干燥为宜。

三、标本的固定

标本干燥后,需将其固定。目的是使菌体蛋白质凝固在玻片上,不致于染色时被染液或水冲去;并使涂面上的细菌易染色。如果固定不良,尤其组织触片,常有菌体冲脱现象。

固定方法有两种:一为火焰固定,是最常用的方法。即将标本片面向上,用拇指和食指拿住玻片的一端,在火焰上较迅速地来回通过3~4次,以手背触及玻片,稍感烫手为宜(约60°C),这样标本就固定好了。这种方法在研究微生物的结构时并不适用,应改用化学固定法。常用的化学固定剂有酒精、甲醇、丙酮等。方法是取化学固定剂滴于玻片涂膜上(要盖满涂面),或将玻片浸在盛有化学固定剂的玻缸内,放一定时间,倾去化学固定剂用水轻轻冲洗,即可染色。

四、组织切片染色标本的处理

组织切片如用石蜡包埋,应先除去石蜡,然后进行染色。方法:用二甲苯除去石蜡,再用酒精除去二甲苯,然后用水冲去酒精,再进行染色。染色后加无水酒精脱水,再用二甲苯使呈透明,最后加盖玻片封片。

封片用加拿大树脂即松香,将其溶解于二甲苯中,使有适宜的粘度。组织标本的涂盖剂也有用DPX剂,其配方为:

苯二甲酸二丁酯	5 毫升
二甲苯	35 毫升
distrene 80	10 克

其中苯二甲酸二丁酯是一种增韧剂,又是透明液体,无酸性,不使染

色标本脱色,用法同加拿大树脂。

组织切片染色处理技术:将固定有石蜡切片的玻片,放入二甲苯中脱石蜡,继加无水酒精数滴使玻片成不透明状。倾注 50% 酒精少许,继用水冲洗。如用曾克氏液(Zenker's fluid)固定的组织,须先以革兰氏碘液处理 2~3 分钟,然后用 95% 酒精冲洗,最后用水冲洗后染色。再用水冲洗沥干,并用吸水纸吸干。继则加 95% 酒精数滴,再用无水酒精脱水,然后将玻片浸在二甲苯中。取出玻片用吸水纸除去二甲苯,滴加拿大树胶一滴并加盖玻片即成。

细菌组织标本因细菌易受酒精处理脱色,故用苯胺二甲苯混合液,其配制比例为 2:1。经混合液脱水后再水洗并用吸水纸吸干。然后用苯胺二甲苯混合液除去水分,同时使标本透明。最后用二甲苯除去苯胺,并即用树胶封盖。

第二节 染液的配制

用于细菌染色的染料大多为碱性的,常用有亚甲蓝(美蓝)、复红、结晶紫、龙胆紫、俾斯麦褐、沙黄和孔雀绿等。酸性染料有伊红、酸性复红和胭脂红等。

以上常用的亚甲蓝、复红、结晶紫和龙胆紫,可预配饱和酒精液,贮存有色瓶中,临用时取澄清液或滤液最为方便。

未染色的细菌标本,在显微镜下仅靠它与周围环境折光性的不同才能看到,如果加以染色则可清楚显示菌象。染色除可清楚看到菌体及其各部构造外,特殊染色法还可作为鉴定细菌种类的条件之一。

大部分用作染色的染料,都是含有苯环的有机化合物。一般常用染料都是一些盐类,碱性染料由一带色的阳离子及一不带色的阴离子组成(例如美蓝 $+ Cl^-$),而酸性染料则相反(例如 Na^+ 伊红 $^-$),染料的着染作用和细菌的电荷关系很大。细菌主要由于含蛋白质而具兼性离子的性质,其等电点酸性基含碱性基的离解度相等的 pH 值。在中性溶液中细菌都带阴电。当溶液的 pH 增高时,细菌的阴电荷增加,故摄取碱性染料力较大。在一般情况下,细菌都带阴电,故细菌染色都用碱性染料。

有时在染色时还须加入媒染剂,以增加染料与被染菌间的亲和力,或使染料固定在被染菌体上,或改变细胞膜的渗透性。细菌学上常用的媒

表 1-1 常用染料于水中及酒精中溶解度

染料名称	溶于 100 毫升溶剂中的克数	
	于水中	于 95% 酒精中
结晶紫	1.68	13.87
甲基紫	2.93	15.21
龙胆紫	参照上两种	参照上两种
碱性复红(新)	1.13	32.0
美蓝(氯化物)	3.55	1.48
中性红(氯化物)	5.64	2.45
沙黄	5.45	3.41
孔雀绿(草酸盐)	7.60	7.52
伊红 Y(钠盐)	44.20	2.18
俾斯麦褐 Y	1.36	1.08
俾斯麦褐 K	1.10	0.98
胭脂红	1.68	0.01
刚果红	0	0.19

染料有碘、石炭酸、明矾、硫酸亚铁等。

第三节 常用染液染色法

一、吕氏(Löffler's)亚甲蓝染色法

【染液配制】

亚甲蓝饱和酒精溶液

80 毫升

苛性钾水溶液(1:10000)

100 毫升

【染色法】

(1) 涂膜标本, 固定后, 滴加染液约 2 分钟。

(2) 水洗,用吸水纸吸干,滴加香柏油镜检。

(3) 如系切片标本须延长染色 5 分钟或更久,不用酒精脱色,用苯胺二甲苯混合液作为脱水和使标本透明。然后封片镜检。

二、多色性亚甲蓝染色法

【染液配制】 多色性亚甲蓝系用吕氏亚甲蓝经缓慢氧化而成紫色化合物,故染色后呈多色性。缓慢成熟方法:将亚甲蓝染液装玻璃瓶中成半量,经常摇动玻瓶,成熟时间须 6~12 个月或更久。本染液在兽医炭疽检验上用作麦克法田氏反应试验(Mcfadyean's reaction)。

【染色法】 方法同亚甲蓝染色。用于炭疽病理材料的染色,可见菌体呈蓝色,荚膜呈红紫色。

三、革兰氏染色法

革兰氏染色法是细菌检验中最重要和常用的一种方法。所用染料通常为玫瑰苯胺,如甲基紫、结晶紫和龙胆紫。以结晶紫最好。现常用的有:

1. 强森氏(Jensen's)改良法

【染液配制】

(1) 0.5% 甲基紫 6B 水溶液,或 0.5% 结晶紫水溶液

(2) 碘溶液——此溶液较革兰氏碘溶液浓 3 倍

碘	1 克
碘化钾	2 克
蒸馏水	100 毫升

(3) 复染液——中性红溶液

中性红	1 克
1% 醋酸	2 毫升
蒸馏水	1000 毫升

【染色法】 标本制作按常规,并干燥固定。

(1) 加甲基紫溶液经半分钟,倾去染液,滴加碘溶液冲去甲基紫,并保留碘液作用约 1 分钟。

(2) 用酒精洗去碘剂,并用酒精脱色,直至涂膜不再有色素溶出。

(3) 水洗。