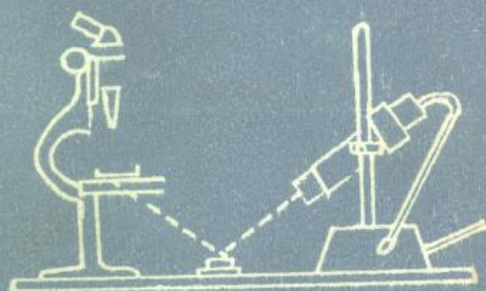


布氏菌病实验室技术



吉林省地方病第一防治研究所

布氏菌病实验室技术

(第 二 版)

G. G. 阿 尔 顿

L. M. 琼 斯 著

D. E. 比 兹

朱 龙 基 译

王 永 成

何 永 山 校

吉林省地方病第一防治研究所

1 9 8 0

封面设计 姚克成

布氏菌病实验室技术

G.G.阿尔顿

L.M.琼斯·著

D.E.比·著

朱 德 基 译
王 永 成
何 永 山 校

吉林省地方病第一防治研究所

内 部 材 料

镇赉劳改总队机关印刷厂印刷

开本 1092×787 1/32 印张

1980年10月 字数115千字

印数1——2000册 本费1.15元

内 容 提 要

本书比较详尽地介绍了布氏菌病的实验室技术方法。其内容涉及布氏菌病的细菌学、血清学和变态反应的诊断方法，菌苗生产和使用方法，以及布氏菌属分类、布氏菌噬菌体、绵羊型和犬型布氏菌等。本书在第一版的基础上，对上述内容做了充分的修改，并引入了最新的资料，增加了绵羊型和犬型布氏菌两章。

本书可供医学研究单位、医学院校、卫生学校等科研、教学和兽医、卫生防疫人员参考。

译 者 序

自一八八七年英国军医Bruce分离出布氏菌病的病原体以来,迄今已有近百年的历史。随着历史的发展,人们逐渐地认识到布氏菌病是一种带有全球性的人、畜共患的传染病,常由病畜传染给人。一九五〇年联合国卫生组织和粮农组织共同成立了布氏菌病专家委员会,对布氏菌病的防治及理论课题进行定期讨论,并定期向各国介绍有关该病的研究进展情况。近年来,布氏菌病在各方面的研究都有一定的进展。特别是在布氏菌病实验室技术方面,如病原学、噬菌体、特异性免疫球蛋白的分离纯化研究、血清学、细菌学诊断技术的改进等都有些新的进展,为消灭人、畜布氏菌病创造了有利条件。

《布氏菌病实验室技术》一书第二版是G·G·Alton、L·M·Jones和D·E·Pietz合编的。它受到世界卫生和粮农组织布氏菌病专家委员会的推荐,与第一版比较,在内容上做了充分的修改和增补。书中详细地介绍了布氏菌的分离培养,分型鉴定,各种血清学诊断技术,变态反应诊断技术和变应原的生产及其应用,以及菌苗的生产、检定和使用的方法,并增加了绵羊型布氏菌和犬型布氏菌两章。所推荐的技术方法都是国际上常用的标准方法,对实验室工作人员有较大的参考价值,故全部译出。它的印出,对兽医工作者,卫生防疫工作者,特别是布氏菌病实验室工作人员,以及科研和教学单位,在研究和防治布氏菌病工作中定会有所帮助。

对于本书的内容，我们认为比较好，如能取其精华，结合我国的具体情况，运用到实际工作中去，对我国布病防治工作将会起到积极的作用。但是，由于我们水平所限，错误之处在所难免，敬望广大读者批评指正。

在我们翻译过程中，某些部分曾参考了第一版中文本的译法，在此特向第一版译者们表示衷心的感谢。

译 者

一九七九年十月

前 言

目前，布氏菌病仍然是一种具有公共卫生和经济重要性的世界范围的动物病。一些国家，通过旨在消灭传染动物的办法，已经成功地根除了牛的布氏菌病。另一些国家正在积极采取根除的步骤。绵羊和山羊的布氏菌病（人类主要的传染源）仍在蔓延，特别是在发展中国家。而且，对绵羊和山羊的布氏菌病几乎还没有理想的防治办法。猪的布氏菌病（尽管它的流行较其他两型少得多）对人有很大的病原性。通过预防接种可在某种程度上控制牛、绵羊和山羊的布氏菌病。然而，更理想的根除方法，则有赖于鉴别和消灭传染动物。但若要有成功，需要以正确的实验室技术为依据。

本书的第一版是以世界粮农组织早期的工作文献为基础，并注意收集一些著名的报告和已确定了的方法。它有两个主要的目的，其一是为了使各国布氏菌病实验室中应用的各种方法标准化，以便使每个实验室的试验结果更易于比较；另一是为了对实验工作者提供情报和各种方法，使其扩大布氏菌病实验室活动的范围，希望能促进各项根除计划的顺利进行（特别是对山羊、绵羊和猪）。

1970年，世界粮农和卫生组织布氏菌病专家委员会，建议编出本书的第二版。其所有章节都做了充分修改和引入了最新的内容，并增加了绵羊和犬型布氏菌两个新章。尤其是在血清学方法这一章里做了大量的补充，包括了美国农业部的

各种方法，这些方法在北美和南美已经被广泛应用。其他几种改良的血清学方法，经专家委员会讨论亦第一次被编入，英国卫桥兽医中心实验室主任及其助手欣然复审了他们实验室首先叙述的各种方法。

世界粮农和卫生组织对阿尔顿医生、琼斯医生和比兹医生在编著本书中所付出的创造性劳动表示感谢和赞赏。

目 录

导 言	(1)
第一章 细菌学方法	(3)
处理传染或可能传染材料的预防办法	(3)
培养基	(7)
离心沉淀: 相对离心力和离心速度	(16)
实验室检查标本的收集	(18)
布氏菌的镜检	(20)
标本的培养	(23)
用接种动物的方法分离布氏菌	(26)
在含有CO ₂ 的空气中培养布氏菌	(27)
布氏菌的检定	(30)
布氏菌株的分型	(39)
布氏菌种保管	(60)
悬液中布氏菌的计数	(62)
第二章 血清学方法	(67)
导 言	(67)
生产布氏菌抗原的牛型菌的培养	(68)
美国农业部(USDA)试管凝集试验	(74)
平板凝集试验	(80)
欧洲试管凝集试验	(84)
报告凝集反应结果的国际单位制	(89)
补体结合试验	(93)

混合式补体结合技术.....	(99)
用于检查牛布氏菌病的	
Hill'S补体结合方法.....	(115)
补体结合试验的自动化.....	(122)
缓冲布氏菌抗原试验.....	(123)
巯基乙醇试验.....	(125)
Coombs (抗球蛋白) 试验.....	(127)
布氏菌乳汁环状试验.....	(132)
血清学交叉反应.....	(140)
第三章 变态反应试验	(142)
导 言.....	(142)
变态反应试验的应用范围.....	(142)
变应原的特性.....	(146)
各种变应原的生产和使用.....	(147)
第四章 布氏菌苗的生产	(153)
导 言.....	(153)
牛型布氏菌19号菌苗.....	(154)
羊型布氏菌 Rev.1 菌苗.....	(162)
第五章 绵羊型布氏菌 (Bi.ovis)	(167)
导 言.....	(167)
预防接种.....	(167)
诊断方法.....	(168)
第六章 犬型布氏菌 (Br.Canis)	(173)
导 言.....	(173)
诊断方法.....	(173)
参考文献	(179)

导 言

布氏菌属包括六种细菌，即：羊型、牛型、猪型、沙林鼠型、绵羊型和犬型布氏菌。

羊型布氏菌引起绵羊和山羊的布氏菌病，但也在牛中引起活动性疾病。它是人类中一个很重要的动物病。羊型布氏菌有 3 个生物型，它们彼此间的差别仅在于对单相特异血清的反应不同。

牛型布氏菌病在牛中引起传染性流产，它有 9 个生物型。在生化和血清学反应方面彼此不同。但是全部菌株能被牛型噬菌体溶解和在氧化代谢试验中显示出独特的特性，其他动物感染牛型布氏菌与牛比较是少见的，但麻烦的是它常常引起人类的传染。

猪型布氏菌有 4 个生物型，前 3 个生物型是猪的主要病原体，但是猪 2 型在流行时能波及欧州野兔(*Lepus europaeus*) 猪 4 型能引起驯鹿(*Rangifer tarandi*) 的布氏菌病，猪型布氏菌对人类有很强的病原性。

沙林鼠型布氏菌是从沙漠森林鼠(*Neotoma lepida*) 中分离的。这种动物栖息在美国西部地区。沙林鼠型布氏菌作为一种病原体的重要性尚不知道，因为已被分离到的只有 27 株培养物，而且还没有从家畜动物或人类中分离出来。

绵羊型布氏菌引起普遍传播的疾病，即公羊付睾炎，它在世界大部分主要绵羊饲养地区中，有重大的经济意义。虽

然主要是感染公羊但是在母羊中也能发生一过性感染。绵羊型布氏菌能否在人类中引起疾病还不知道。

犬型布氏菌在狗中引起强烈感染，公狗和母狗都能被传染。除了在人类中有少数病例外，其他动物的传染仍然没有报告。牛型、羊型或猪型布氏菌的散发性传染，在狗中也能发生。

上述前 4 型布氏菌一般呈光滑型，而绵羊型和犬型布氏菌则为粗糙型。粗糙型细菌需要一些特殊的专门的操作方法，由于这个缘故，仅适用于绵羊型和犬型布氏菌的那些方法，不论是细菌学的或者是血清学的，在本书单独两章中叙述。本书的其他部分除了那些特殊的方法以外，着重于 3 个主要的光滑型布氏菌。

第一章 细菌学方法

处理传染或可能传染材料的预防办法

实验室工作者在处理含有布氏菌的材料或在可能暂时被这些细菌污染的环境中工作，若没有有效的预防办法，就有罹患布氏菌病或遭受超敏感性反应的严重危险。这里将叙述一些能够消除这种危险的预防办法。详细情况请看Shapton和Board (1972)的著述。

此外，应当强调，菌苗和抗原的生产应当在单独的实验室内进行，完全同从事布氏菌分离和分型的实验室分开。为了避免菌苗和抗原受有毒布氏菌株或布氏菌噬菌体污染，这样做是必要的。

野外标本的收集：

1、应当戴手套和注意不要沾染容器的外边，如果意外地发生沾染，这个容器必须用消毒方法处理。

2、运送标本的容器应当坚固和密闭，而且内容物的性状应当明确地标明。

3、用于采取标本的那些材料应彻底处理，建议放在密封的塑料包内，送至最近的灰化炉灰化，所有的污染面和所用器材都应当消毒。

实验室内应采取的一般预防措施：

- 1、在可能的时候，传染材料应在无菌操作箱内操作，对操作羊型或猪型布氏菌的材料，这样处理尤其重要。
- 2、若没有无菌操作箱，就应穿着防护服装，包括手套和面罩。
- 3、工作结束后，各种材料应当处理，或放入密封的容器内送灰化炉灰化，或放在密闭的金属容器内高压灭菌。含有牛奶或血液的能够再用的玻璃器材高压后难以清洗，可先将瓶内容物倒入消毒剂或适宜的容器中进行高压，瓶子本身则可放入含有消毒剂的单独容器中浸泡或放入消毒剂中高压，然后清洗。
- 4、各种可能被污染的物体表面，应当用消毒剂洗刷。

特殊实验过程应采取的措施：

应当认识到，产生布氏菌气溶胶的各种过程对实验室工作者具有很大的危险，例如：吹出吸管中最后的液滴，吸管中菌液滴落，离心沉淀和引起泡沫产生的任何过程，如振摇菌液等。使用有效的安全操作箱能保护操作者免遭这些危险。

1. 在抗原生产中，最好使用低毒菌株，如牛型1119—3株或牛型99株，这些菌株另外的优点是它们生长不需要 CO_2 ，如果需使用羊型菌株时Rev.1是适合的。即或使用低弱毒菌株进行接种，仍必须防止工作人员意外地将菌液接种到皮肤上，或将菌液飞沫崩溅到眼睛里。无毒甚至杀死的布氏菌也可能引起超敏感性反应。

2. 有毒布氏菌不应在没有棉塞的菌种安瓶内真空冷冻干燥和封口，因为在开瓶时可发生气溶胶。在65页中叙述了一个适用于干燥培养物的方法。

3. 离心沉淀可能引起危险的气溶胶，如果需要离心有毒材料时，应当在安全的操作箱内操作。连续流式离心机不能用于离心有毒菌株。

4. 在做活菌计数稀释菌液时，可用特制的吸管胶帽(Pipette Fillers)(见图1)来代替用嘴吸吸管。在工作台上操作吸管，应铺上一块浸湿消毒剂的台布。毒菌的菌液稀释应在安全无菌操作箱内进行。

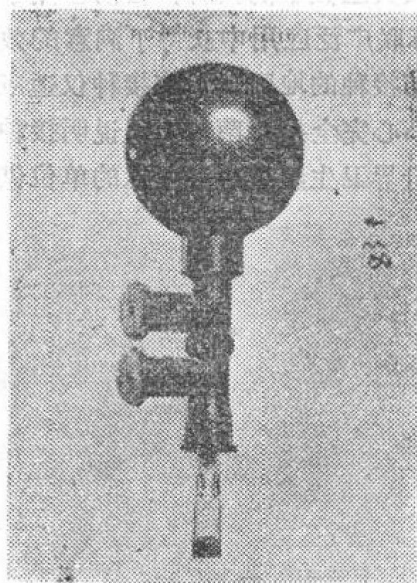


图1： 特制的吸管胶帽

5、操作大量布氏菌的场所，如生产变应原，菌苗等，可以在特殊结构的操作间内进行，以确保能消毒室内空气。设计这样的操作间要便于消毒。如果紫外线能直接照射物体而且灯的距离不超过2米时，紫外线杀死布氏菌才是有效的，这个灯管必须保持无灰尘。

6、饲养感染布氏菌，特别是羊型和猪型菌株的实验动物笼应放在安全室内。

避免实验室感染布氏菌病，尤其要细心操作和有良好个人防护，然而有些操作，如处理大量羊型或猪型布氏菌感染的动物时，就不可避免地存在着产生感染的危险。为预防感染，工作人员应做预防接种，目前已用于皮上划痕的19A菌苗，在苏联广泛应用中获得了满意的效果，并推荐用于人群需要预防接种的地区，预防接种仅适应于皮肤试验阴性的人。如果小心完全按照菌苗使用说明接种，就不会有不幸反应发生，世界卫生组织将对承认的单位供应这种菌苗。

培 养 基

除特殊目的,固体培养基适用于布氏菌分离和培养,它有利于布氏菌菌落的认识和分离,也有利于防止它们的变异。对于液体材料(特别是血液),液体培养基比固体培养基更便于接种较多量的材料。在抗原和菌苗生产中,液体培养基,维持在氧压、PH等一定条件下,能增加布氏菌大培养的产量。特殊过程需要的培养基将在那些过程中叙述。

某些布氏菌株,特别是初代分离时,需要在培养基中含有血清才能生长。血清—葡萄糖琼脂,血清—胰蛋白胨琼脂和血清—胰酶消化大豆琼脂,被认为是最好的基础(非选择性)培养基。蛋白胨琼脂和胰酶消化大豆琼脂可用于干燥商品,在水化和灭菌后加入5%血清。需要经常注意培养基检定,其详细方法参见14页。

如有其他细菌严重污染可能时,除了推荐的基础培养基,还应同时接种能抑制杂菌生长而不明显影响布氏菌生长的选择培养基。选择培养基制备可将Kuzds和Morse(1953)提出的各种抗菌素加到基础培养基中。加入乙基紫染料(Renoux, 1954)可使选择培养基更有效地抑制杂菌,但须注意,有一些对染料敏感的布氏菌株,它们在含有乙基紫的培养基中将不能生长,当怀疑标本已被严重污染和可能含有对染料敏感的布氏菌时,可以一式两份进行培养,即:

(1) 培养基含有血清和各种抗菌素并加乙基紫。

(2) 含有各种抗菌素的同样培养基,但不加乙基紫。