

布氏菌病实验室技术

(附布氏菌病防治和研究的进展)

G. G. 阿尔顿 等著
L. M. 琼斯

.5

科学出版社

布氏菌病实验室技术

(附布氏菌病防治和研究的进展)

G. G. 阿尔顿 L. M. 琼斯等著

农林部兽医药品监察所第二细菌室
中国医学科学院流行病学研究所布病组合译

科学出版社

1975

内 容 简 介

本书介绍了布氏菌病实验室技术和有关布氏菌病防治方法的问题。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、布氏菌病免疫球蛋白、人和动物的免疫、牛羊人工免疫试验、人畜布氏菌病的预防和消灭措施等方面。

本书可供赤脚医生、赤脚兽医、基层兽医和卫生防疫人员、布氏菌病防疫及实验室工作人员、教学工作者参考。

G. G. Alton & L. M. Jones
LABORATORY TECHNIQUES IN
BRUCELLOSIS
World Health Organization 1967
and
JOINT FAO/WHO EXPERT
COMMITTEE ON BRUCELLOSIS
Fifth Report World Health Organization 1971

布氏菌病实验室技术

(附布氏菌病防治和研究的进展)

G. G. 阿 尔 顿 L. M. 琼 斯等著
农林部兽医药品监察所第二细菌室合译
中国医学科学院流行病学研究所布病组

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1975年11月第一版 开本: 787×1092 1/32

1975年11月第一次印刷 印张: 5

印数: 0001—11,450 字数: 110,000

统一书号: 16031·31

本社书号: 556·16

定价: 0.42 元

譯 者 序

本书是两本小册子编译而成的,其中一本是G.G.Alton和L.M.Jones合编的《布氏菌病实验室技术》(世界卫生组织出版,1967),另一本是《联合国粮农组织和世界卫生组织布氏菌病专家委员会第五次报告》(该两组织出版,1971)。这两本小册子关系密切,互为补充,故一并译出,编为一书,取名《布氏菌病实验室技术(附布氏菌病防治及研究的进展)》出版。

《布氏菌病实验室技术》是该书作者根据粮农组织和世界卫生组织布氏菌病专家委员会第四次报告所介绍的实验室方法编写成的。书中详细介绍了布氏菌的分离培养,检定分型,各种血清学和变态反应诊断试剂的制造和应用,以及畜用菌苗的生产、检定和使用的方法。所推荐的方法都是国际通常采用的方法,都比较简单易行,实用,对实验室工作和检疫人员有参考价值,故全部译出,编为本书的第一部分。

《布氏菌病专家委员会第五次报告》是该委员会在1970年召开的一次会议的总结报告。报告中扼要报道了自该委员会第四次报告公布以来(1963)到1970年这一段时间内,各国在布氏菌防治和研究方面取得的成就。内容包括布氏菌属的分类、布氏菌噬菌体、血清学诊断试剂的标化、免疫球蛋白、人和动物的免疫、菌苗的生产和保存、牛羊人工免疫试验的成果等。虽然技术细节报道的较简单,但内容广泛,基本上反映了当前在人、畜布氏菌病这个领域内各个方面的进展情况,有助于了解国外防治和研究布氏菌病的动态。我们根据

国内防治和研究的需要，摘译其中一部分，编为本书的第二部分。凡与本书第一部分重复或与我国目前实际关系不大的章节均未译出，有些章节则仅译其大意。

本书的出版对乡村的赤脚医生、赤脚兽医、基层兽医和卫生防疫人员，布氏菌病实验室工作人员，学校教学人员在防治布氏菌病工作中可能有所帮助。对于本书的内容，应该用一分为二的观点，去粗取精，结合我国的具体情况，批判地取舍。由于我们水平低，错误之处在所难免，希望读者提出指正。

译 者

1974年9月

目 录

译者序	(v)
-----	-----

第一部分 布氏菌病实验室技术

序 言	(1)
第一章 细菌学方法	(2)
培养基	(2)
病料的收集与培养	(10)
用接种动物方法分离布氏菌	(15)
在含有二氧化碳的空气中培养	(16)
布氏菌的检定	(17)
用染色方法检查布氏菌	(18)
观察菌落形态的方法	(19)
布氏菌菌株的分型	(22)
菌种保存	(37)
菌液中的布氏菌体的计数	(38)
第二章 血清学方法	(41)
试管凝集试验	(41)
凝集抗原的制造	(42)
抗原的标定	(43)
报告凝集反应结果的国际单位制	(45)

	标准干燥血清的制造.....	(46)
	平板凝集试验.....	(48)
	补体结合试验.....	(52)
	布氏菌全奶环状试验.....	(61)
	奶清凝集试验.....	(66)
	血清辅助试验.....	(66)
第 三 章	变态反应试验.....	(67)
	布氏菌水解素.....	(67)
	猪牛羊型抗原 (MBP Antigen)	(70)
	马尔他菌素.....	(72)
第 四 章	布氏菌苗的生产.....	(75)
	流产布氏菌19号菌苗.....	(75)
	马尔他布氏菌Rev.1菌苗	(83)
	马尔他布氏菌死菌佐药苗.....	(88)

第二部分 布氏菌病防治和研究的进展

第 一 章	导 言.....	(90)
第 二 章	流行病学.....	(91)
	对人的传染.....	(91)
	野生动物宿主和在自然界的分布.....	(93)
	食物里的布氏菌.....	(94)
第 三 章	布氏菌属.....	(97)
	分类.....	(97)
	布氏菌的分型、培养和保存.....	(98)
	布氏菌的抗原.....	(99)
	布氏菌的遗传学	(100)
第 四 章	布氏菌噬菌体	(102)

第五章	血清凝集试验和补体结合试验的标化和判定	(104)
第六章	其他试验	(105)
	被动血球凝集试验.....	(105)
	抗球蛋白(改良的 Coombs') 试验.....	(105)
	免疫荧光试验.....	(106)
第七章	抗布氏菌免疫球蛋白	(106)
	布氏菌病产生的免疫球蛋白.....	(107)
第八章	人类布氏菌病	(108)
	临床表现.....	(108)
	诊断标准.....	(109)
	治疗.....	(111)
	菌苗接种.....	(113)
第九章	牛布氏菌病	(115)
	诊断方法.....	(115)
	菌苗接种.....	(122)
	牛感染马尔他布氏菌.....	(126)
	防制和消灭.....	(127)
第十章	山羊布氏菌病	(128)
	传染和发病机制.....	(128)
	诊断试验.....	(129)
	给山羊接种菌苗.....	(133)
	防制.....	(134)
第十一章	绵羊布氏菌病	(135)
	诊断.....	(137)
	绵羊用菌苗.....	(138)
	防制.....	(139)
	绵羊布氏菌感染(公羊附睾炎).....	(140)

第十二章	猪布氏菌病	(142)
	诊断.....	(143)
	接种菌苗.....	(144)
	预防.....	(144)
第十三章	其他动物的布氏菌病	(145)
	狗的布氏菌病.....	(145)
	水牛和其他牛类布氏菌病.....	(146)
	驯鹿和其他鹿类的布氏菌病.....	(148)
	骆驼的布氏菌病.....	(148)
	马的布氏菌病.....	(149)
	家禽布氏菌病.....	(149)
第十四章	迟发性过敏	(150)

第一部分

布氏菌病实验室技术

序 言

布氏菌病在世界许多地区仍然是一种重要的人、畜共患传染病。本病的防治主要依靠在细菌学和血清学技术方面有相当经验的实验室与完善的人医和兽医服务部门的密切合作。

研究人畜布氏菌病专用的试验方法，已经在世界许多实验室中应用。但是，某些标准操作方法在许多实验室中还没有当作常规使用。因此使国际间的相互比较感到非常困难。还有一些实验室只使用有限的几种方法，而不赶上新近的技术发展。在没有适当的实验室设备和在新近由于引进患畜而发生了布氏菌病的地区，重要的问题则是应该尽快建立研究布氏菌病的实验室和部门。

一个时期以来，有些国家要求粮农组织和世界卫生组织提供布氏菌病实验室技术的情报。这个单行本是想把通常使用的和国际上相同的细菌学和血清学试验方法编在一起，并提供一些有关菌苗的生产和检定的技术资料。选入本书中的方法，都是一些在设备简陋的实验室中使用时，作者们在自己的经验中认为满意的方法。需要高度专门化仪器和人员的试验方法，不列入本书中。这些仪器和人员在发展中国家的实验室里往往是缺乏的。编者并不认为本书所介绍的方法一定比

其他实验室所用的方法好。

有些方法已经在国家实验室里和在粮农组织和世界卫生组织布氏菌病中心应用了许多年，但一般都还没有正式发表的文件可采用。其他方法以前已由粮农组织和世界卫生组织在联合布氏菌病专家委员会的各次报告中，或在《人畜共患传染病防治的进展》一书中发表过了。

本书的初稿于1963年由粮农组织以工作文件的形式首次印行。后来一个修订本发给了许多布氏菌病工作者传阅。他们的评论和建议在本书最后定稿时都考虑进去了。……

第一章 细菌学方法

培养基

培养布氏菌一般以固体培养基为宜。此类培养基便于识别和分离生长的菌落，并能限制非光滑变种的形成。至于培养某些液体材料，特别是血液，则以液体培养基为适宜，因为它比固体培养基能够培养较大量的病料。

有些布氏菌菌株，培养时需要血清或吐温40(Tween40)才能生长。由于这个原因，血清葡萄糖琼脂或吐温葡萄糖琼脂被认为是最好的常规培养基。如果遇到病料有可能污染杂菌，可采用 Kuzdas和Morse二氏(1953)提出的选择性培养基，此种培养基是在基础培养基中加入抗菌素制成的。加入乙基紫(Renoux,1954)使此种选择性培养基更能有效地抑制杂菌。但必须记住，有许多布氏菌菌株对染料敏感，这些菌株在含有乙基紫的培养基上是不生长的。如果怀疑材料严重污染并可能含有对染料敏感的菌株，可采用同时接种两种培养基的办法来处理这个问题。一种是含有血清（或吐温

40) 和抗菌素而无染料的选择性培养基；另一种是含有抗菌素和乙基紫的选择性培养基。

检查野外材料时,为了一般的诊断目的,除了选择性培养基外,还须在含有5%或10%血液琼脂上作培养,俾能检出其他细菌。

一、培养基的制备

1.营养琼脂

营养琼脂是制备即将介绍的其他培养基的基础培养基。因此先叙述营养琼脂的制造。多数实验室有它们自己的试用得很好的制造营养琼脂的方法。良好的脱水培养基也可以在市场上买到。以下是英国威桥中央兽医实验所使用的方法：

蒸馏水	1,000毫升
琼脂	20克
蛋白胨	10克
氯化钠	5克
肉膏	5克

将以上成分置容器中,在流通蒸汽锅中加热一小时。调整pH到7.8后,将容器置于高压灭菌器中,使蒸汽压力上升到20磅/平方英寸(1.4公斤/平方厘米),并立即降压,使磷酸盐沉淀。培养基通过纸浆过滤,再调整pH到7.4,定量分装于玻璃瓶中。在15磅/平方英寸压力下灭菌15分钟。

2.血清葡萄糖琼脂

将上述营养琼脂溶化,冷却至50℃,按比例每95毫升营养琼脂加入血清葡萄糖原液(制法见下节)5毫升。充分混合后即可使用,例如如果需要,就可用以倒入平皿。

马或牛的血清均可应用。血清应事先证明不含有布氏菌凝集素,并经56℃灭活30分钟。血清葡萄糖溶液是这样配制的:按1克葡萄糖与5毫升血清的比例,将纯净的葡萄糖溶解于灭活的血清中。溶液经蔡氏滤器过滤,作无菌检查,保存于冰箱中,或结冻保存备用。

3.吐温葡萄糖琼脂

需要血清才能生长的布氏菌菌株,如果在上述培养基中用吐温40代替血清,将生长得很好。营养琼脂在灭菌之前,每100毫升加入0.5毫升的吐温40,灭菌后冷却至60℃左右,每95毫升培养基加入20%葡萄糖溶液(蔡氏滤器过滤)5毫升。

4.甘油葡萄糖(2:1)琼脂

灭菌营养琼脂冷却至50℃,加入事先经蔡氏滤器过滤的甘油和葡萄糖混合液,使甘油在培养基中的最后浓度为2%,葡萄糖为1%。也可以在营养琼脂消毒前加入2%的甘油和琼脂,冷却至50℃后加入经蔡氏滤器过滤的20%葡萄糖溶液,使葡萄糖在培养基中的最后浓度为1%。

5.马铃薯浸液琼脂

取生的优质的马铃薯,用水洗净,去皮,称取250克,直接削薄片入1,000毫升蒸馏水中,以尽量减少暴露于空气。混合物置于有盖的容器内,放在60℃过夜,然后用滤纸或数层纱布过滤。

滤过液用蒸馏水补足到1,000毫升,然后加入以下成份:氯化钠5克,蛋白胨10克,牛肉浸膏5克和琼脂25克。混合物加热使琼脂溶解(流通蒸汽中一小时)。加入20毫升甘油,并

调整pH至7.4（如用蒸馏水，高压灭菌后pH将为6.8，如认为必要，可以调节，使最后制品的pH为6.8）。培养基于15磅/平方英寸压力下灭菌20分钟。

6.血清马铃薯琼脂

上述马铃薯琼脂于高压灭菌后待冷却至50℃时。每90毫升培养基加入10毫升血清。所用血清，不论是马的或牛的均须无布氏菌凝集素，并须在56℃灭活30分钟，蔡氏滤器过滤，使用前作无菌检查。

7.脱水培养基

常用的脱水培养基是：trypticase-soy琼脂、tryptose琼脂和Albimi琼脂。每种培养基按照制造厂说明书配制和灭菌。为促进某些营养要求严格的菌株的生长，在此类商品培养基中加入5—10%的血清是必要的。如需用抗菌素和染料，可按下面即将叙述的方法加入培养基中。

应当强调，每批新的脱水培养基应当与已知有效批号的培养基作比较，以检验其支持布氏菌生长的能力。一个培养基瓶中，各种成分分布不均匀时，以瓶上部制出的培养基和底部制出的培养基作比较，有时可能得到不同的结果。同一种脱水培养基中的某些批号，在加入染料时生长不好，而另一些批号则生长好。

8.选择性培养基

上述血清葡萄糖琼脂、吐温葡萄糖琼脂、血清马铃薯浸液琼脂或其他脱水培养基均可作为配制抑制大多数杂菌而不影响布氏菌生长的选择性培养基的基础培养基。Kuzdas和Morse二氏（1953）提出的选择性培养基，要求每100毫升基

基础培养基中加入下列药品：放线酮10毫克，杆菌肽 2,500 单位，乙种多粘菌素600单位（该二氏提出的原始培养基中还包括有Circulin,但此药已不再能买到）。

除这些抗菌素外，还可加入乙基紫染料，使最后浓度为 1 : 80万（Renoux,1954）。

抗菌素和乙基紫原溶液的配方如下：

放线酮（Cycloheximide）* 取一克放线酮粉末溶于100毫升蒸馏水中，蔡氏滤器过滤。亦可将粉末溶于少量丙酮中，然后用灭菌蒸馏水稀释至1%，不必再消毒。此溶液颇稳定，在普通冰箱中可保存6个月。

杆菌肽（Bacitracin）此抗菌素通常以瓶装无菌粉剂出售。每瓶含药50,000单位。将全瓶粉剂溶于20毫升蒸馏水中，即足以配制2公升的选择性培养基。如不需用全部原液，可分成适当的小批，在结冻状态下可保存二周。

乙种多粘菌素（Polymyxin B.）¹⁾ 此抗菌素通常亦为瓶装粉剂，每瓶含药50万单位。若将全瓶内容物溶于83.3毫升灭菌蒸馏水中，则每毫升溶液将含药6,000单位。每毫升可配制一公升选择性培养基。此原液可分成数小瓶，在结冻情况下保存，最好在-20℃以下保存。原液解冻后如一时不能用完，不应再重新结冻保存。

乙基紫（Ethyl violet）配成0.1%水溶液较方便。配制时必须注意保证完全溶解。此原液勿须过滤或消毒，但每三个月应重新配制一次。

基础培养基溶化和冷却到50℃后，每100毫升按规定剂

* 放线酮的商标名称为Actidione。

1) 乙种多粘菌素可用国产硫酸抗敌素（E种多粘菌素）代替，用法和用量与乙种多粘菌素同。——译者注

量加入上述各种原液：放线酮 1 毫升；杆菌肽 1 毫升；乙种多粘菌素 0.1 毫升，必要时加入乙基紫 0.125 毫升。混匀后立即倾注平皿。

平皿制好后，虽然最好当日使用，但在冷处也可以保存一周。用前可将平皿揭开，培养基面朝下，置于 37℃ 保温箱中 2 小时或置于 60℃ 烤箱中 10 分钟烤干。

9. 血液培养用的培养基

建议用 Castañeda 氏 (1947) 介绍的在一个瓶中装有液态和固态两相的培养基。使用这种培养基可以不必反复将液体培养基再移植到固体培养基上。

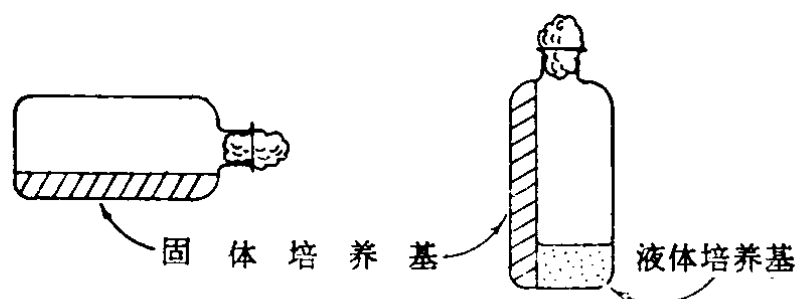


图 1 Castañeda 氏制备血液培养瓶的方法

为方便起见，可以使用上面提到的脱水培养基，但要另外加入琼脂，使最后含量为 2—2.5%，这样才能保证固体培养基附着在瓶壁的一侧上。选用的琼脂培养基加热溶化后，分装适量于培养瓶中，置高压灭菌器中消毒。消毒完毕，将瓶取出，平置案上，使琼脂沿瓶壁的一侧凝固（图 1，左）。作血液培养时，用 125 毫升容量的医用扁瓶来分装此种培养基最好。

液态培养基（肉汤）按制造厂说明书配制，但要加入枸橼酸钠，使最后浓度为 2%。肉汤经高压灭菌和冷却后，以无菌手术加入已装有固体培养基的培养瓶中，每个 125 毫升的扁瓶加入 15 毫升肉汤（图 1，右）。

培养瓶在使用前，应于37℃保温箱中培养数日，作无菌检查。培养瓶用橡皮帽封口比用棉花塞封口方便得多，因为橡皮帽可以用注射针头穿刺入瓶内，如图1所示。血液培养瓶的用法将在12页讨论。

二、培养基的检验

过份强调需要经常不断地检查培养基对支持受检材料中可能存在的布氏菌的生长的能力是困难的，最好用生长要求严格的、需要血清才能生长的牛型布氏菌第二生物型或其他合适的培养物的少量菌数（约100个菌），接种于每批培养基的几个平皿上作培养检查。为了避免每次检查都要配制细菌稀释液，可将稀释好的布氏菌液冻干，使每安瓶含有适量的菌数。如无此条件，可用蛋白陈生理盐水配制布氏菌稀释液，这些稀释液如果在冰箱中保存，一周内仍可产生同样的结果。如有可能，检验新批号的培养基时，应同时用一批已知质量的培养基作比较试验。

三、配制布氏菌混悬液用的稀释剂

1. 磷酸盐缓冲生理盐水

以磷酸盐缓冲剂调节到所需pH值的生理盐水（8.5克氯化钠溶于1公升蒸馏水中），常用来收获布氏菌和配制布氏菌混悬液，特别是用来制造菌苗。

下表表示，1公升生理盐水中加入磷酸二氢钾（ KH_2PO_4 ）和无水磷酸氢二钠（ Na_2HPO_4 ）的克数和所产生的缓冲盐水的pH值：

· 8 ·