

普通高等学校特色专业建设教材

动物医学实验教程

预防兽医学分册

第2版

Dongwu Yixue
Shiyan Jiaocheng

周杰 主编



中国农业大学出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS

普通高等学校特色专业建设教材

动物医学实验教程

预防兽医学分册

第2版

周 杰 主编

中国农业大学出版社

· 北京 ·

内 容 简 介

本教材第1版是国内第一部基础兽医学综合实验教程,出版后深受教师和学生的欢迎。本次修订根据专业发展的要求,结合编者教学研究成果,重新整合了教材体系。

本教材包括实验概述、基本实验、课程实习和附录,主要内容有实验基本要求、常用实验仪器使用和常用器皿的准备,兽医微生物学与免疫学实验、兽医传染病学实验、兽医寄生虫学实验、兽医公共卫生学实验,动物疫病防治课程实习。

本教材主要服务于动物医学及相关专业本科学生学习,也可为动物医学及相关领域从业人员提供参考。

图书在版编目(CIP)数据

动物医学实验教程.预防兽医学分册/周杰主编.—2版.—北京:中国农业大学出版社,2017.6
ISBN 978-7-5655-1828-7

I. ①动… II. ①周… III. ①兽医学-实验医学-教材 IV. ①S85-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 113431 号

书 名 动物医学实验教程(预防兽医学分册)第2版

作 者 周 杰 主 编

策划编辑 孙 勇

责任编辑 田树君

封面设计 郑 川

责任校对 王晓凤

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路2号

邮政编码 100193

电 话 发行部 010-62731190,2620

读者服务部 010-62732336

编辑部 010-62732617,2618

出 版 部 010-62733440

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

E-mail cbsszs@cau.edu.cn

经 销 新华书店

印 刷 北京时代华都印刷有限公司

版 次 2017年8月第2版 2017年8月第1次印刷

规 格 787×1092 16开本 15印张 360千字

定 价 32.00元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

编审人员

主 编 周 杰

副主编 吴金节 李 郁 王桂军 方富贵 祁克宗

编 者 (以姓氏笔画为序)

方富贵 王桂军 刘雪兰 孙 裴

祁克宗 吴金节 李 郁 周 杰

徐前明 潘 玲

主 审 李培英(安徽农业大学)

编者的话

《动物医学实验教程》是安徽农业大学动物医学专业在“安徽省高校省级教改示范专业”项目和教育部高等学校“第一类特色专业建设点”项目的建设过程中,经过不断探索与改革实践后逐渐总结形成的。《动物医学实验教程》立足动物医学实验课程体系的构建,建立了以验证性基础实验、提高性综合实验和学科群综合实习三个层次为基础的实验教学模式。《动物医学实验教程》面世后,不仅在本校使用,还被全国不少农业院校选用,受到教师和学生的广泛好评。

近年来,随着高等学校教育改革的进一步深化,我校对本科人才培养方案进行了较大幅度的修订,进一步加强了实践教学环节。2013年以来,本专业承担了安徽省高等教育振兴计划《地方高水平大学建设》子项目——动物医学重点专业建设,在项目建设过程中,越来越认识到实践教学在保证和提高动物医学及相关专业人才培养质量中的重要作用。为适应专业发展,满足动物医学专业人才培养的需要,编者在原版教材内容的基础上进行了修订。

《动物医学实验教程》(第2版)在整体编排上沿用了《基础兽医学分册》《预防兽医学分册》和《临床兽医学分册》三个分册的形式,以便本系列教材不仅能为动物医学专业所用,也能服务于相关专业。如动物科学专业可单独使用《基础兽医学分册》,动物检疫专业可选用《基础兽医学分册》和《预防兽医学分册》。考虑到有些专业可能单独使用本教程中的某个分册,在各分册的实验概述中都有一些关于动物实验基本操作技术或器械使用的内容,其中有部分内容可能有一定重复。

《动物医学实验教程》(第2版)各分册在编排上将原版中的验证性实验和综合性实验两部分合并为基本实验板块。为方便各课程实验的开展,基本实验板块按课程实验内容的形式编排。本次修订根据行业要求更新了一些实验内容,并引入了新的教学成果,同时对部分实验内容进行了增删和整合。

《动物医学实验教程》(第2版)的内容以动物医学专业的课程实验和课程实习为主。本系列教材主要服务于农业院校动物医学及相关专业本科学生学习动物医学实践技能,也可为动物医学及相关领域从业人员提供参考。

由于编者的知识水平所限,书中的不妥之处在所难免,恳请广大读者批评指正。

编者

2016年10月

前 言

《动物医学实验教程》(预防兽医学分册)出版后,不仅在本校动物医学专业、动物检疫专业使用,还被许多兄弟院校选用,深受教师和学生的欢迎。本次修订按我校教学大纲制定的课程计划编写,包括兽医微生物学与免疫学、兽医传染病学、兽医寄生虫学和兽医公共卫生学4个学科。考虑到实际操作上的便利,按课程实验、课程实习教学模式编写,改变第1版中分为验证性实验、综合性实验和课程实习的形式,使教程在使用过程中更加符合实验教学的安排规律。即合并原“验证性实验”和“综合性实验”项,“课程实习”项保留。合并的实验项按各实验课程编排。

本次修订保留了第1版中的一些经典内容,并对部分内容进行了更新。如有关PCR仪和酶标仪仅保留方法介绍和原理,删除所有的操作步骤。“兽医微生物学与免疫学实验”中删除了间接血凝实验,增加了实验动物免疫与抗体制备等。“兽医传染病学实验”补充了鸡白痢的净化和动物传染病诊疗现场教学。“兽医公共卫生学实验”中增加了动物性食品致泻大肠埃希氏菌检测、动物性食品金黄色葡萄球菌检验、动物皮毛炭疽检疫、动物布鲁氏菌病检疫等内容,删除了动物食品中亚硝酸盐的测定和有机磷残留量测定等内容。其他各课程的实验项目也都有所更新,使本教材的应用性更强。此外,对第1版中发现的错误之处进行了修改。

本书的编写凝聚了各位编者在教学过程中的经验,教材中多数图片和病例资料都来自编者多年积累的素材。书中还借鉴了国内一些兄弟院校的相关教材和资料,在此表示诚挚的谢意!对于同仁们对本书的编写所给予的关心、支持与帮助表示衷心感谢!

编 者

2016年10月

目 录

第一部分 实验概述

第一章 预防兽医学实验室学生实验守则	3
第二章 预防兽医学常用实验仪器	5
第三章 常用器皿的准备	7

第二部分 基本实验

第四章 兽医微生物学与免疫学实验	13
实验一 显微镜油镜的使用与细菌形态观察	13
实验二 细菌涂片的制备与染色法	16
实验三 培养基配制	19
实验四 热力消毒与灭菌法	21
实验五 细菌的分离与移植	24
实验六 抗菌药物敏感性试验	28
实验七 动物实验法	31
实验八 酵母菌及霉菌的形态观察	34
实验九 细菌的生化试验	35
实验十 葡萄球菌检验	40
实验十一 肠杆菌科细菌检验	42
实验十二 芽孢杆菌的诊断	46
实验十三 病毒鸡胚培养	50
实验十四 鸡胚原代细胞培养	54
实验十五 琼脂双向扩散试验	57
实验十六 细菌凝集试验	59
实验十七 免疫电泳	61
实验十八 对流免疫电泳	63
实验十九 补体结合试验	64
实验二十 酶联免疫吸附试验	66
实验二十一 实验动物免疫与抗体的制备	68
第五章 兽医传染病学实验	70
实验二十二 消毒	70
实验二十三 免疫接种	74
实验二十四 病料的取材与送检	78

实验二十五	结核病的检疫	80
实验二十六	巴氏杆菌病的实验室诊断	83
实验二十七	链球菌病的实验室诊断	84
实验二十八	鸡白痢的净化	86
实验二十九	动物传染病诊疗现场教学	87
实验三十	猪瘟的实验室诊断	88
实验三十一	口蹄疫的实验室诊断	89
实验三十二	新城疫的实验室诊断	93
实验三十三	猪圆环病毒感染的诊断	95
第六章	兽医寄生虫学实验	99
实验三十四	蠕虫学粪便检查技术(一)	99
实验三十五	蠕虫学粪便检查技术(二)	101
实验三十六	蠕虫学粪便检查技术(三)	104
实验三十七	动物主要吸虫病病原形态学观察	107
实验三十八	绦虫蚴和绦虫的形态学观察	111
实验三十九	动物线虫病病原形态学观察(一)	115
实验四十	动物线虫病病原形态学观察(二)	118
实验四十一	动物棘头虫病病原形态学观察	121
实验四十二	蜘蛛昆虫的形态学观察	123
实验四十三	动物原虫病病原形态学观察	127
实验四十四	动物血吸虫病实验室诊断技术	130
实验四十五	隐孢子虫病的诊断	134
第七章	兽医公共卫生学实验	138
实验四十六	动物性食品中菌落总数的测定	138
实验四十七	动物性食品中大肠菌群的测定	141
实验四十八	动物性食品中沙门氏菌的检验	143
实验四十九	动物性食品致泻大肠埃希氏菌检测	148
实验五十	动物性食品金黄色葡萄球菌检验	152
实验五十一	旋毛虫病肉的检验	155
实验五十二	动物皮毛炭疽检疫	157
实验五十三	动物布鲁氏菌病检疫	159
实验五十四	动物性食品中总汞的测定	166
实验五十五	动物性食品中砷的测定	170
实验五十六	动物性食品中克伦特罗残留量的测定	172

第三部分 课程实习

第八章	动物疫病防治课程实习	179
实验一	鸡传染性法氏囊病的诊治	179
实验二	家禽大肠杆菌病的诊治	182

实验三	高致病性猪繁殖与呼吸综合征疫情处置技术·····	184
实验四	畜禽完全剖检术及蠕虫标本采集与制作·····	188
实验五	畜禽细菌性自家灭活疫苗的制备与检验·····	190
实验六	鸡球虫病的病例复制、诊断与防治·····	192
附录	·····	198
附录一	常用试剂及其配制·····	198
附录二	特殊染色法·····	204
附录三	常用培养基配方·····	207
附录四	附表·····	214
参考文献	·····	227

第一部分
实验概述



第一章

预防兽医学实验室学生实验守则



在预防兽医学实验中,操作者经常要接触一些病原微生物与寄生虫,有被感染的危险性。为保证实验效果,避免病原微生物及寄生虫的实验室污染,保证实验操作者的安全,要求必须遵守以下规则:

(1)学生在每次实验课前,认真预习实验内容,明确实验目的与要求,了解实验原理和主要实验过程,做到心中有数,思路清晰。如有疑问,应事先请教指导教师。

(2)请勿把不必要的物品带入实验室,必须要带的书本、文具等应放在远离实验操作台的指定位置,以免污染。进入实验室,必须穿好工作服,离开实验室时脱下反叠带走。

(3)实验室内应保持安静,不得大声喧哗和随便走动。严禁吸烟、进食、饮水,严禁用嘴吸取移液及湿润标签,尽量不要用手触摸头、面部及身体其他暴露部位。实验过程中要小心仔细,严格按操作规程进行,若发现问题,在独立思考、分析原因的基础上找指导教师帮助。

(4)如遇不慎打破菌种管或使有菌(或寄生虫)材料污染皮肤、衣物、桌面等情况,应立即报告指导教师,切勿隐瞒或自行处理。

(5)需培养(或处理)的材料,应标明组别、名称及处理方法,放于教师指定的地点进行培养(或处理)。实验室中的菌种及其他物品,未经教师许可,不得携出室外。

(6)认真观察、分析实验结果,以实事求是的科学态度记录在实验报告中。如实验报告与理论不一致时,应分析原因,培养自己独立思考、分析问题和解决问题的能力。

(7)实验完毕,清理实验用品,物归原处。实验废弃物应放入或倒入指定地点或容器内。吸过菌液(或虫卵)的吸管、毛细滴管等放入消毒缸内;用过的玻片放入装有消毒液的陶瓷(玻璃)缸内,绝不能乱放在桌面上。

(8)离开实验室前,要用肥皂洗手,必要时用消毒液浸泡双手,然后用清水洗净。关好水、电、门、窗后方可离开实验室。

此外,实验时若不慎发生意外事故,应立即报告指导老师,进行紧急处理。皮肤创伤:先除尽异物,用无菌生理盐水洗净,再涂以2%红汞或2%碘酒进行消毒,必要时进行包扎。烧灼伤:涂以无毒的液体石蜡、5%鞣酸或2%苦味酸。化学腐蚀伤:强酸腐蚀应先用大量清水冲洗,再以5%碳酸氢钠溶液洗涤中和;强碱腐蚀伤应先以大量清水冲洗,再以5%醋酸

溶液洗涤中和。若眼部受伤,经上述方法处理后,再滴入无菌液体石蜡 1~2 滴。吸入菌液:应立即吐入盛有消毒液的容器内,以大量清水或 3% 双氧水漱口,并根据菌种的不同服用相应的抗生素以预防。菌液溅洒桌/地面:应立即用抹布浸消毒液,盖在污染部位,经半小时后再抹去。若菌液、感染阶段的寄生虫等污染手部,应立即将手浸泡于消毒液内 10~20 min,再用肥皂刷洗。

(王桂军)



第二章

预防兽医学常用实验仪器



一、PCR 扩增仪

(一) PCR 扩增仪

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)是 20 世纪 80 年代中期发展起来的体外核酸扩增技术。它具有特异、敏感、产率高、快速、简便、重复性好、易自动化等突出优点;能在一个试管内将所要研究的目的基因或某一 DNA 片段于数小时内扩增至 10 万倍乃至百万倍,使肉眼能直接观察和判断;可从一根毛发、一滴血甚至一个细胞中扩增出足量的 DNA 供分析和检测鉴定。过去几天几星期才能做到的事情,用 PCR 几小时便可完成。PCR 技术是生物医学领域中的一项革命性创举和里程碑。

(二) PCR 技术的基本原理

类似于 DNA 的天然复制过程,其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 由变性—退火—延伸三个基本反应步骤构成:①模板 DNA 的变性:模板 DNA 经加热至 93℃左右一定时间后,模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离,使之成为单链,以便它与引物结合,为下轮反应做准备;②模板 DNA 与引物的退火(复性):模板 DNA 经加热变性成单链后,温度降至 55℃左右,引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合;③引物的延伸:DNA 模板-引物结合物在 Taq DNA 聚合酶的作用下,以 dNTP 为反应原料,靶序列为模板,按碱基配对与半保留复制原理,合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链,重复循环变性—退火—延伸三过程,就可获得更多的“半保留复制链”,而且这种新链又可成为下次循环的模板。

二、酶标仪

(一) 酶标仪

酶联免疫检测仪(酶标仪)是酶联免疫吸附试验的专用仪器,又称微孔板检测器。可简单地分为半自动和全自动两大类,但其工作原理基本上都是一致的,其核心都是一个比色计,即用比色法来进行分析。测定一般要求测试液的最终体积在 250 μL 以下,用一般光电比色计无

法完成测试,因此对酶标仪中的光电比色计有特殊要求。光源灯发出的光波经过滤光片或单色器变成一束单色光,进入塑料微孔板中的待测标本,该单色光一部分被标本吸收,另一部分则透过标本照射到光电检测器上。光电检测器将透射过待测标本后强弱不同的光信号转换成相应的电信号,电信号经前置放大、对数放大、模数转换等处理后,送入微处理器进行数据处理,转换成相应的浓度,最后由显示器和打印机输出结果。

(二)酶联免疫吸附剂测定原理

使抗原或抗体结合到某种固相载体表面,并保持其免疫活性。使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体,这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性又保留酶的活性。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开,最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化变为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据颜色反应的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化频率很高,故可极大地放大反应效果,从而使测定方法达到很高的敏感度。

(王桂军)

第三章

常用器皿的准备

预防兽医学实验室内应用的器皿种类甚多,器皿用前必须干燥清洁,而且要绝对无菌。如在配制培养基的过程中,必须使用一些玻璃器皿,如三角瓶、试管、培养皿、烧杯、吸管等,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,进行包装、灭菌后,才能使用。因此,从事微生物工作的人员应熟悉和掌握各种器皿用前用后的处理。

一、玻璃器皿的准备

(一)玻璃器皿的清洗

1. 新玻璃器皿

新玻璃器皿含有游离碱,一般先将其浸于 2% 盐酸溶液中数小时,然后用自来水清洗干净。也可将器皿先用热水浸泡,再用去污粉或肥皂刷洗,最后经过热水洗刷、自来水清洗,待干燥后,灭菌备用。

2. 用过的玻璃器皿

盛有废弃物的试管或三角瓶,因其内含大量微生物,洗刷前应先经过高压蒸汽灭菌。对只带有细菌标本或培养物的试管等玻璃器皿,用过后应立即将其浸于 2% 来苏儿消毒水中,经 24 h 后,才可以取出洗刷。

用蜡封口的试管或液体石蜡发酵用瓶,清洗前先将其置于高压蒸汽灭菌器中消毒,然后取出,趁热拔去沾有蜡或油的棉花塞,立即倒去培养污物,再将试管投入温水中,稍加洗刷后浸于 5% 肥皂水内,煮沸 5 min,以去除试管上的油污。也可将倒空的瓶子用汽油浸泡,待油溶解后再刷洗。加过消泡剂的发酵瓶或做过通气培养的大三角瓶,一般先将倒空的瓶子用碱粉或用 10% 火碱水去掉油污后,再行洗刷。管壁或瓶壁上留有培养物的痕迹,用试管刷难以去除,可用一根粗铁丝把顶端弯曲,捆几层纱布,浸润,蘸一点去污粉,或再蘸少许细沙,擦磨管壁或瓶壁,就可把器壁的痕迹擦掉。

3. 培养皿的清洗

用过的器皿中往往有废弃的培养基,需先经高压蒸汽灭菌或沸水煮沸 30 min 后,倒掉污物,方可清洗。如果灭菌条件不便,可将皿中培养基刮出来,倒在一起,以便统一处理。洗刷时,先用热水洗一遍,再用洗衣粉或去污粉擦洗,然后用自来水冲洗干净,将平皿全部向下,一

个压着一个,扣于洗涤架上或桌子上。

4. 吸管的清洗

吸过菌液的吸管,用完后应放入装有5%石炭酸溶液的高玻璃筒内消毒;未吸过菌液的吸管,用后放入清水中,防止干燥;吸过带油液体的吸管,应先在10%NaOH溶液中浸泡0.5h,去掉油污,方可清洗。如果吸管经以上处理仍留有污垢,可置于洗液中浸泡1h,再进行清洗。吸管上端的隔离棉花,可用普通钢针制成的小钩钩出,清洗时,将直径为6~7.5mm的橡胶管一端连在自来水龙头上,另一端套在吸管的低端,放水冲洗即可。洗净的吸管顶端向下,下面垫一块干净的厚布或几层纱布,使吸管的水分能迅速被吸干。

附:洗液配制方法

浓洗液配方:重铬酸钾40g,浓硫酸800mL,水160mL。

稀洗液配方:重铬酸钾50g,浓硫酸100mL,水850mL。

配制方法:将重铬酸钾溶于水,冷却后,边搅拌边将浓硫酸缓缓加入溶液中。

5. 玻片的清洗

用过的玻片浸泡于2%来苏儿或5%石炭酸溶液中消毒,48h后取出,置肥皂水中煮沸,洗刷后,再用清水冲洗干净,拭干保存,或浸泡95%酒精中以备用。

(二)器皿的包扎

1. 试管和三角瓶

灭菌前,试管口和瓶口均需先塞好棉花塞,不可塞得过紧,也不能过松,和管壁、瓶壁紧贴的曲面不可出现裂纹。待棉塞塞好后,再在棉塞的瓶口外面包一层牛皮纸,用线绳扎好,置于烘箱中灭菌备用。

2. 培养皿

洗净的平皿通常用纸包装,每包10~12套。或将平皿放置一个特制的铁皮筒中,加盖,置烘箱中灭菌备用。

3. 吸管

包扎前吸管的粗头应先塞少许棉花,以免应用时因不慎而将菌液吸入口中,或将口内物吹入培养液中。塞入的棉花应与吸管口保持5mm左右的距离,若距离太近,容易被唾液浸湿,造成通气不良。一般这段棉花全长不得短于10mm。塞好棉花的吸管要进行包装。将纸裁为宽5~8cm的长纸条,先把试管的尖端放在纸条的一端,呈45°角折叠纸条,包住尖端,一手捏住管身,一手将吸管压紧在桌面上,向前滚动,以螺旋式包扎,最后将剩余的纸条打结,灭菌备用。

(三)器皿的用前消毒

普通玻璃器皿在用前应以干热灭菌法(140~160℃,1~2h)灭菌,也可用高压蒸汽灭菌法(121.3℃,15~20min)灭菌。

二、塑料或乳胶制品的准备

1. 聚乙烯板的清洗

用过的聚乙烯板应及时浸泡于洗洁精温水中,用纱布擦洗。切勿用硬物擦拭,否则易留下划痕。再用清水冲洗干净,晾干备用。如果经以上处理仍留有污垢,可再置于洗液中浸泡过夜