

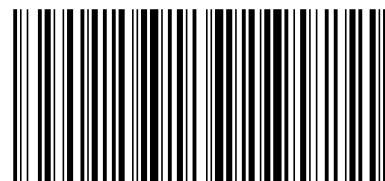
A.3 改良 Dubos 培养基

胰蛋白胨	25 g	天门冬素	0.3 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄)	2.5 g	磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	1.0 g
柠檬酸铁铵	0.05 g	硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.6 g
甘油	25 mL	1%吐温-80	50 mL
琼脂	15.0 g		

逐一加入蒸馏水中,轻轻加热,令其溶解加蒸馏水至 800 mL,115.5℃灭菌 15 min,pH7.2,此即为基础培养基,置 4℃~6℃保存备用。

使用时,将基础培养基溶化,冷至 50℃~56℃,加入草分枝菌素 20 mg。青霉素 10 万单位,氯霉素 50 mg,放线菌酮 0.1 g,无菌牛血清 200 mL,充分混匀后用 1 mol/L 氢氧化钠调 pH 值至 7.2,分装螺帽试管,摆成斜面,令其凝固。37℃温箱中培养 48 h,无杂菌生长时放在 4℃冰箱中备用。

副结核病细菌学检查操作规程

Protocol of bacteriological examination for *Mycobacterium paratuberculosis*

SN/T 1472—2004

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·2-16071

定价: 6.00 元

2004-11-17 发布

2005-04-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

附录 A
(资料性附录)
试剂配制

A.1 萋-尼氏抗酸染色法

A.1.1 染色液

A.1.1.1 石炭酸复红液:取碱性复红 3.2 g,溶于 95%酒精 100 mL 中,制成饱和液成为复红原液,取复红原液 1 份,加 5%石炭酸水溶液 9 份,混合,滤纸过滤。

A.1.1.2 3%盐酸酒精:取浓盐酸 3 mL,加 95%酒精 97 mL。

A.1.1.3 碱性美蓝染色液:取美蓝 1.48 g,加 95%酒精 100 mL 溶解制成饱和液成为美蓝原液,取原液 30 mL 加入 0.01%氢氧化钾(KOH)液 100 mL,混合,滤纸过滤。

A.1.2 染色方法

A.1.2.1 取制好的涂片在酒精灯火焰上固定,以其背面在酒精灯火焰上来回通过数次,略作加热(但不能太热,以不烫手背为度)进行固定。

A.1.2.2 将涂片滴满石炭酸复红染色液,用试管夹夹住载玻片,在酒精灯上加热 3 min~5 min,以冒蒸汽不沸腾为度,冷却,水洗。

A.1.2.3 用 3%盐酸酒精脱色至玻片上无红色为止,充分水洗。

A.1.2.4 用碱性美蓝复染约 1 min,水洗。用滤纸吸干或晾干、镜检。

抗酸性细菌呈红色,非抗酸性细菌呈蓝色。

如标本片呈红色或棕色,表示复染不足,应再复染 5 s~10 s,再观察,如仍未全呈蓝色,仍可复染,至符合要求为止。

A.2 马铃薯汤培养基

A.2.1 制马铃薯汤

取红皮马铃薯,洗净,去皮,切成小方块,按 1:50 加入蒸馏水,煮沸 20 min~25 min,纱布过滤。补足失去水分,4℃保存。

A.2.2 鸡蛋的处理

用含有清洁剂的水刷洗鸡蛋表面,用水冲洗数遍,将其放在 70%的酒精中 30 min,用无菌的毛巾擦干,用无菌的鼠牙镊子敲击鸡蛋的一端,打开大约 10 mm 的一个洞,利用重力及镊子移走蛋白,将蛋孔开大,倒出蛋黄于灭菌烧杯中,混匀。

A.2.3 配方

天门冬素	1 g	磷酸二氢钾[KH ₂ PO ₄ (AR)]	1 g
硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.05 g	枸橼酸铁	0.12 g
甘油	6 mL	吐温-80	1.5 mL
草分枝菌素	0.1 g	马铃薯浸液	100 mL
蛋黄液	200 mL	2%孔雀绿	4 mL

将前六种成分加入马铃薯浸液中,在水浴中加热溶解。

草分枝菌素加入少量乙醇,约 10 mL,在水浴中加热溶解后加于马铃薯浸液中,继续加热 10 min~20 min,冷至 50℃~55℃,加入蛋黄液和孔雀绿,搅匀。用四层纱布过滤,分装螺帽试管,80℃~85℃灭菌 1 h,次日,再如此灭菌一次,置 4℃冰箱备用。

中华人民共和国出入境检验检疫
行业标准
副结核病细菌学检查操作规程
SN/T 1472—2004

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街 16 号
邮政编码:100045

网址 www.bzcs.com

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 9 千字
2005 年 2 月第一版 2005 年 2 月第一次印刷

*

书号:155066·2-16071 定价 6.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533

3.1.4 样品的保存及送检

采集的样品可冻结保存送检,常温下的样品应在 24 h 内送抵实验室。样品内不应加任何化学防腐剂。

3.2 样品的处理

3.2.1 乳汁的处理

取牛奶样本 100 mL 加 2 mg 脂肪酶(1 800 IU/mg)37℃消化 2 h~3 h,再加入等量的草酸、孔雀绿混合液充分混匀,37℃水浴中放 30 min 去杂菌,并不时的振摇,5 000 r/min 离心 30 min,弃上清,取沉淀物接种于马铃薯汤培养基上,或通过 0.45 μm 滤膜的过滤器,大约要滤过 100 mL 的牛奶,移下滤膜,用少量含有 0.5%吐温-80 的 PBS 液漂洗后,取约 3 滴~5 滴接种到马铃薯汤培养基上。并制成涂片(染色前,先用乙醚-乙醇的等分液固定并脱脂约 10 min)、镜检。

3.2.2 粪便的处理

称取粪便 3 g,加入灭菌生理盐水 40 mL 充分混匀,用四层纱布过滤,滤液中加入等量的草酸、孔雀绿混合液,振摇 15 min,接着 2 500 r/min 离心 15 min,弃上清,再加 6 mL 的两性霉素 B 和新霉素的混合液,在旋涡振荡器上短暂混匀,室温下(20℃~22℃)孵育 18 h~24 h,5 000 r/min 离心 30 min,弃上清,取沉淀物接种于马铃薯汤培养基上,并制成涂片,火焰固定,萁-尼氏抗酸染色(参见附录 A),镜检。

3.2.3 肠段及淋巴结的处理

3.2.3.1 肠段

将肠剪开,用无菌水轻轻冲洗肠内容物,于玻璃上摊开肠管,粘膜面朝上,用载玻片或外科刀刮取粘膜约 10 g~20 g 放于灭菌的带有铜纱网的乳钵中,边研磨边加入 0.5%胰酶水溶液 40 mL 使呈混悬液,并用 1 mol/L 的氢氧化钠调 pH 至 9.0,放在烧杯中,在磁力搅拌器上室温搅拌约 1 h,5 000 r/min 离心 30 min,弃上清液,取沉淀物悬浮于 20 mL 灭菌生理盐水中,再加入等量的草酸、孔雀绿混合液,充分混匀,37℃水浴中放 30 min 去杂菌,并不时的振摇,5 000 r/min 离心 30 min,弃上清液,取沉淀物一环接种于马铃薯汤培养基。并制成涂片,火焰固定,萁-尼氏抗酸染色,镜检。

3.2.3.2 肠淋巴结

称取 10 g~20 g 淋巴结,剔除外面脂肪后剪碎,放在灭菌的带有铜纱网的乳钵中研磨,其余操作与肠段相同。

4 样品的镜检

涂片做萁-尼氏抗酸染色,镜检。副结核杆菌在显微镜下呈红色球杆状、成丛成堆排列(3 个以上),视野中背景为蓝色。如一张标本能检出抗酸性杆菌的团块,则可怀疑为本病。

5 样品的培养

处理后的样品,每份接种 3 管~5 管,置 37℃培养,拧紧螺帽,每周观察并放气一次,同时在试管中加 0.1 mL 的灭菌生理盐水。一般经 5 周~6 周可出现肉眼可见的、针状的、灰白或灰黄色隆起、不透明、边缘不太整齐的菌落,涂片做萁-尼氏抗酸染色,镜检可见到红色成丛的小杆菌。未长出菌落的培养管,需培养 3 个月,若仍未长菌,方可弃去。

分离出的细菌培养物再接种于改良 Dubos 培养基,同时设不加分枝杆菌素的培养基对照。37℃培养 25 d~30 d,观察细菌生长情况。

6 结果判定

如在含分枝杆菌素的改良 Dubos 培养基上有菌生长,而在不含分枝杆菌素的培养基上无菌生长,镜检为抗酸染色阳性的红色成丛小杆菌,并出菌时间较长(3 周~3 个月)时,即认为是副结核分枝杆菌。

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由国家认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国山西出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:巩红霞、李卫华、廉慧锋、付英文、李惠萍。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。