

# 《兽医公共卫生学》实验指导

## 实验一 新鲜肉旋毛虫镜检法检查

旋毛虫病是重要的人畜共患寄生虫病，它是由毛形科的旋毛形线虫（*Trichinella spiralis*）成虫寄生于肠管，幼虫寄生于横纹肌所引起的。该病流行于哺乳类动物间，鸟类可实验感染。人若摄食了生的或未煮熟的含旋毛虫包囊的猪肉可感染生病，主要临床表现为胃肠道症状、发热、肌痛、水肿和血液嗜酸性粒细胞增多等，严重者可以导致死亡，故肉品卫生检验中将旋毛虫列为首要项目。旋毛虫病的肉品检验是生猪屠宰检疫中的一项重要内容，通过该项检验可以检出感染旋毛虫的猪只。对于杜绝病猪肉流入肉品市场，有着重要的作用。

### 一、实验目的

1. 掌握肌肉旋毛虫压片镜检操作方法。
2. 掌握肌肉旋毛虫消化法的操作方法。

### 二、实验器材

#### （一）旋毛虫压片镜检法

1. 材料：横膈肌适量。肋间肌、腰肌、咬肌、舌肌也可。
2. 器材：载玻片、剪刀、镊子、天平、显微镜。
3. 试剂：甘油透明液（甘油 20mL 加双蒸水至 100mL），稀盐酸（盐酸 20mL 加双蒸水至 100mL）。

#### （二）旋毛虫集样消化法

1. 材料：横膈肌适量。肋间肌、腰肌、咬肌、舌肌也可。
2. 器材：组织捣碎机、磁力加热搅拌器、80 目铜筛、漏斗、分液漏斗、载玻片、表面皿、烧杯、剪刀、镊子、天平、温度计、显微镜。
3. 试剂：胃蛋白酶消化液（胃蛋白酶（3000 国际单位）10g、盐酸 10mL 加蒸馏水至 1000mL，加温 40℃ 搅拌溶解，现用现配）。

### 三、实验步骤

#### （一）旋毛虫压片镜检法

1. 采样。自胴体左右两侧横膈膜的膈肌脚（见图 1-1），各采膈肌 1 块（与胴体编成相同号码），每块肉样不少于 20g，记为一份肉样，送至检验台检查。如果被检样品为部分胴体，则可从肋间肌、腰肌、咬肌等处采样。

2. 肉眼检查。撕去被检样品肌膜，将膈肌肉缠在检验者左手食指第二指节上，使肌纤维垂直于手指伸展方向，再将左手握成半握拳式，借助于拇指的第一节和中指的第二节将肉块固定在食指上面，随即使左手掌心转向检验者，右手拇指拨动肌纤维，在良好的光线下仔细检查表面有无针尖大半透明乳白色或灰白色隆起的小点。检验完一面后再将膈肌翻转，用同样的方法检验膈肌的另一面。凡发现上述小



图 1-1 取左右膈肌脚样品



图 1-2 撕开肌膜肉眼观察

点可怀疑为旋毛虫病灶（见图 1-2）。未钙化的包囊呈露滴状，半透明，细针尖大小，较肌肉的色泽淡；随着包囊形成时间的增加，色泽逐步变深而为乳白色、灰白色或黄白色。若见可疑病灶时，做好记录且

告知总检将可疑肉尸隔离，待压片镜检后做出处理决定。

3. 压片。取清洁载玻片1块放于检验台上，并尽量靠近检验者。用镊子夹住肉样顺着肌纤维方向将可疑部分剪下。如果无可疑病灶的，则顺着肌纤维方向在肉块的不同部位剪取12个麦粒大小的肉粒（2块肉样共剪取24个小肉粒）。将剪下的肉粒依次均匀地附贴于载玻片上且排成两行，每行6粒。然后，再取一清洁载玻片盖放在肉片的载玻片上，并用力适度捏住两端轻轻加压，把肉粒压成很薄的薄片，以能通过肉片标本看清下面报纸上的小字为标准。另一块膈肌按上法制作，两片压片标本为一组进行镜检（见图1-3）。

4. 镜检。把压片标本放在低倍（4×10）显微镜下，从压片的一端第一块肉片处开始，顺肌纤维依次检查。镜检时应注意光线的强弱及检查速度，切勿漏检。

5. 结果判定。

(1) 没有形成包裹的幼虫，在肌纤维之间呈直杆状或逐渐蜷曲状态，但有时因标本压得太紧，可使虫体挤入压出的肌浆中。

(2) 包裹形成期的旋毛虫，在淡黄色背景上，可看到发光透明的圆形或椭圆形物。包裹的内外两层主要由均质透明蛋白质和结缔组织组成，囊中央是蜷曲的虫体（见图1-4）。成熟的包裹位于相邻肌细胞所形成的梭形肌腔内。

(3) 发生机化现象的旋毛虫。虫体未形成包裹以前，包围虫体的肉芽组织逐渐增厚、变大，形成纺锤形、椭圆形或圆形的肉芽肿。被包围的虫体有的结构完整，有的破碎甚至完全消失。虫体形成包裹



图 1-3 制成压片镜检



图 1-4 旋毛虫幼虫包裹

后的机化，其病理过程与上述相似。由于机化灶透明度较差，需用甘油透明液作透明处理，即在肉粒上滴加数滴甘油透明液，数分钟后，肉片变得透明，再覆盖上玻片压紧观察。

(4) 钙化的旋毛虫。在包裹内可见数量不等、浓淡不均的黑色钙化物，包裹周围有大量结缔组织增生。由于钙化的不同发展过程，有时可能看到下列变化：①包裹内有不透明黑色钙盐颗粒沉着；②钙盐在包裹腔两端沉着，逐渐向包裹中间扩展；③钙盐沉积于整个包裹腔，并波及虫体，尚可见到模糊不清的虫体或虫体全部被钙盐沉着。此外，在镜检中有时也能见到由虫体开始钙化逐渐扩展到包裹的钙化过程（多数是由于虫体死亡后而引起的钙化）。发现钙化旋毛虫时，可以通过脱钙处理，滴加稀盐酸将钙盐溶解后，可见到虫体及其痕迹，与包裹毗邻的肌纤维变性，横纹消失。

(5) 鉴别诊断。在旋毛虫检验时，往往会发现住肉孢子虫和发育不完全的囊尾蚴，虫体典型者，容易辨认，如发生钙化，死亡或溶解现象时，则容易混淆，在检查时可参考表1-1进行鉴定。

表 1-1 旋毛虫、住肉孢子虫、囊尾蚴肉眼检查及镜下区别

（引自孙锡斌，旋毛虫病肉的检验和囊尾蚴生活力的测定，1992）

| 项目  | 旋毛虫                   | 住肉孢子虫                  | 囊尾蚴                           |                             |                             |
|-----|-----------------------|------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|     |                       |                        | 发育早期                          | 发育中期                        | 成熟期                         |
| 虫体形 | 呈灰白色半透明小点，包裹呈纺锤形，椭圆形， | 呈灰白色或黄色毛根状小体。镜下，米氏囊内充满 | 粟粒大到米粒大包裹，囊内有可见的白色头节。镜下：头节上有四 | 黄豆大包裹，囊内充满无色液体，白色头节如米粒大。镜下： | 黄豆大包裹，囊内充满无色液体，白色头节如米粒大。镜下： |

| 项目    | 旋毛虫               | 住肉孢子虫                          | 囊尾蚴                            |                      |                      |                                  |
|-------|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------|
|       |                   |                                | 发育早期                           | 发育中期                 | 成熟期                  |                                  |
| 态     | 虫体常蜷曲成S形或8字形      | 香蕉形滋养体和卵圆形孢子                   | 个吸盘, 尚无或有发育不全的角质钩              | 头节上有四个吸盘和角质钩         | 头节上有四个吸盘和角质钩         |                                  |
| 寄生部位  | 多见于膈肌、肩胛肌、腰肌及腓肠肌等 | 骨骼肌、心肌。尤其以食道、腹部、股部等部位寄生最多      | 肩胛外肌、股部内侧肌、心肌、咬肌及腰肌等           | 肩胛外肌、股部内侧肌、心肌、咬肌及腰肌等 | 肩胛外肌、股部内侧肌、心肌、咬肌及腰肌等 |                                  |
| 虫体钙化灶 | 肉眼检查              | 针尖大或针头大, 灰白或灰黄色。与钙化的住肉孢子虫不易区别  | 虫体钙化灶略小于囊尾蚴钙化灶, 呈灰白或灰黄色。触摸有坚实感 | 针尖大灰白色小点             | 粟粒大或米粒大, 呈灰黄色        | 椭圆或圆形, 粟粒至黄豆大, 呈灰白-淡黄-黄色, 触摸有坚硬感 |
|       | 压片镜检              | 包囊内有大小不等的黑色钙盐颗粒, 有的在囊周围形成厚的组织膜 | 数量不等、浓淡不匀的灰黑色钙化点, 有时隐约可见虫体     | 不透明的黑色块状物            | 不透明的黑色块状物            | 不透明的黑色块状物                        |
|       | 脱钙处理              | 虫体或残骸清晰可见                      | 可见虫体或残骸                        | 未见或可见发育不全的角质小钩       | 可见角质小钩               | 可见角质小钩                           |

## (二) 旋毛虫集样消化法

1. 实验原理。先用机械方法将受检肉样捣碎, 使其呈颗粒或絮状, 再用消化酶在最适温度和最佳酸碱度条件下进行生物化学消化。本实验采用快速集样消化法, 即由磁棒转动带动杯中消化液旋转成旋窝, 加速底物消化分解, 同时比水重的有形物质随旋窝的力量向中心移动, 但未消化的巨型肌组织残质则被集虫器外周粗筛阻留, 而虫体或虫体包囊等细小物体随旋窝向中心移动进入集虫器; 当转动停止, 集虫器中的有形物质便随旋窝作用逐渐沉降于底部细筛孔漏掉, 只保留虫体和包囊在筛面上供镜检。

2. 实验方法、步骤和操作要领。

(1) 采样。首先确定群检分组的头数, 每组头数的大小可根据各地区旋毛虫病的发生情况而定, 即在旋毛虫病的低发病地区采取 5-10 头猪为 1 组, 而常年未检出旋毛虫的地区每组可增加到 30-50 头或 100 头。既能因地提高检验工效, 又不致使旋毛虫检验流于形式。如果以 10 头猪为 1 组, 其分组情况应按生产流水线上胴体编号 1-10、11-20、21-30……顺序。每头猪取横膈膜肌脚 2g, 每组 10 头样肉, 共 20g, 依次放在序号相同的采样盘或塑料袋内送检。

(2) 捣碎。按采样盘顺序, 每次取 1 组(20g 肉样, 去除脂肪、筋膜或腱膜), 置组织捣碎机内 2000r/min, 捣碎时间 30s~60s, 以无肉眼可见细碎肉块为度。

(3) 加温搅拌: 将已搅碎的肉样放入置有消化液的烧杯中, 肉样与消化液的比例为 1: 20, 置烧杯于加热磁力搅拌器上, 启动开关, 消化液逐渐被搅成一漩涡, 液温控制在 40~43℃, 加温搅拌 30~60min, 以无肉眼可见沉淀物为度。

(4) 过滤: 取 80 目筛子, 置于漏斗上。漏斗下再接一分液漏斗, 将加温后的消化液徐徐倒入漏斗, 待滤干后, 弃去筛子上的残渣。

(5) 沉淀: 滤液在试管中沉淀 10~20min, 旋毛虫逐渐沉到底层, 此时轻轻分几次放出底层沉淀物于表面皿中。

(6) 漂洗: 沿表面皿边缘, 用吸管徐徐加入 37℃ 温自来水, 然后沉淀 1~2min, 并轻轻沿表面皿边缘再轻轻多次吸出其中的液体如此反复多次, 加入或吸出表面皿中的液体均以不冲起其沉淀物为度, 直至沉淀于表面皿中心的沉淀物上清透明 (或用量筒自然沉淀, 反复吸取上清的方法进行漂洗)。

(7) 镜检。将带有沉淀物的表面皿放在普通显微镜载物台上，旋转圆盘使表面皿中心底部接物镜头下，将表面皿前后、左右来回晃动，使有形成分集中于皿底中心，用 40 倍物镜检查有无旋毛虫虫体、包囊以及虫体碎片或空包囊。

(8) 查病畜胴体。镜检发现阳性时，按圆盘转数(0、1、2、3……顺序)乘以 100(每组头数×圆盘孔数)加孔号乘以 10(每组头数)，即得出该组 10 头猪的胴体编号。计算公式： $\text{圆盘转数} \times 100 + \text{孔号} \times 10$ 。例如：阳性组圆盘转数是 20，孔号数为 3，代入公式为  $20 \times 100 + 3 \times 10 = 2030$ ，该组胴体编号即为 2021、2022、2023……2030 这 10 个号码。将该 10 头猪的胴体全部推入修割轨道待查。复查按每 2 头为一组消化镜检，检出阳性组，再逐头检测，确定病畜胴体。复查时用压片镜检法更快、更方便。

#### 四、实验注意事项

##### (一) 旋毛虫压片镜检法

1. 采样操作过程中，肉样要做好登记编号，不能搞错。
2. 肉眼检查时光线要充足，检查一段时间后再注意休息，避免因疲劳而漏检。
3. 制片时剪取小肉粒应顺肌纤维方向挑取膈肌脚的可疑小病灶剪下。如果无可疑病灶的，则顺着肌纤维方向在肉块的不同部位剪取，不应盲目地集中一处剪样。压片要厚薄适当，不能过厚或过薄，应以能通过肉片标本看清下面报纸上的小字为标准。
4. 检查过程中要注意与住肉孢子虫、囊尾蚴的鉴别。

##### (二) 旋毛虫集样消化法

1. 不能盲目选择群检分组头数的大小，应根据不同地区旋毛虫发生情况而定。
2. 肉样消化过程中注意掌握好酸和酶的浓度，以及消化时的温度。

#### 五、实验报告

1. 简述旋毛虫病肉品检验的常用技术，比较其优缺点。
2. 根据本次实验检验结果，所检肉品该如何处理？

## 实验二 羊布氏杆菌病的 ELISA 检测

### 一、实验目的

掌握 ELISA 检测布氏杆菌病的操作。

### 二、实验原理

ELISA 是免疫技术中应用最广的一种,在适合的载体上,酶标记抗体或抗原与相应的抗原或抗体形成酶标记的抗原-抗体免疫复合物,在一定的底物参与下,复合物上的酶催化底物,使其水解、氧化或还原成另外一种带色物质。由于在一定条件下,酶的降解底物和呈现色泽是成正比的,因此,可以应用酶测定仪进行测定,从而计算出参与反应的抗原和抗体的种类和含量。

### 三、实验试剂与器材

- 1、材料：羊布氏杆菌病 ELISA 检测试剂盒
- 2、器械：微量移液器、酶标仪、tip 头等

### 四、实验内容

- 1、采集羊血液
- 2、分离羊血清
- 3、ELISA 检测

按照试剂盒说明进行操作。

### 五、完成实验报告。

## 实验三 动物性食品中沙门氏菌的检验

### 一、实验目的

- 1、掌握动物性食品中沙门氏菌检验的步骤和方法。
- 2、了解动物性食品沙门氏菌检验的卫生学意义。

### 二、实验器材

## 1、器械

冰箱、恒温培养箱、显微镜、灭菌乳钵、天平、灭菌广口瓶（500mL）、灭菌三角烧瓶（500mL、250mL）、灭菌吸管（10mL）、灭菌培养皿、灭菌小试管、灭菌毛细管、灭菌刀、剪刀、镊子等。

## 2、试剂

缓冲蛋白胨水、亚硒酸盐胱氨酸（SC）增菌液、孔雀绿-氯化镁增菌液、亚硫酸铋琼脂（BS）、SS琼脂、三糖铁琼脂、蛋白胨水、尿素琼脂、糖发酵管等。

## 三、实验内容与方法

### （一）增菌培养

凡经冷冻、干燥、酸碱及辐射处理的食品，需进行前增菌，有利于受损伤菌的恢复，通常用缓冲蛋白胨水（BP）进行前增菌。

#### 1. 前增菌

冻品、蛋品、乳品及其他食品均应经过前增菌。以无菌操作取检样 25g（mL），加在装有 225mL 缓冲蛋白胨水的广口瓶内。固体食品用乳钵磨碎，粉状食品用玻棒研磨使乳化，于 37℃ 培养 4h（干蛋品培养 18~24h），移取 10mL，转种于 100mL 氯化镁孔雀绿增菌液或四硫酸钠煌绿增菌液内，于 42℃ 培养 24h。同时另取 10mL，转种于 100mL 亚硒酸盐胱氨酸增菌液内，于 37℃ 培养 18~24h。

#### 2. 增菌

鲜肉、鲜蛋、鲜奶及其他未经加工的食品不必经过前增菌。各取 25g（mL）和灭菌生理盐水 25mL，按前法做成检样匀液。取半量接种于 100mL 氯化镁孔雀绿增菌液或四硫酸钠煌绿增菌液内，于 42℃ 培养 24h。另取半量接种于 100mL 亚硒酸盐胱氨酸增菌液内，于 37℃ 培养 18~24h。

### （二）分离培养

1. 取增菌液 1 环，划线接种于一个亚硫酸铋琼脂和一个 HE 琼脂平板（或沙门氏菌属显色培养基平板），两种增菌液可同时划线接种在一个平板上。

2. 37℃ 分别培养 18~24h（HE 琼脂）或 40~48h（亚硫酸铋琼脂），观察各个平板上的菌落，对菌落染色进行形态观察。

### （三）生化试验

从选择性琼脂平板上直接挑取数个可疑菌落，分别接种三糖铁琼脂，同时，再接种蛋白胨水、尿素琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基及对照培养基各 1 管，于 37℃ 培养 18~24h。

## 四、完成实验报告。