ICS 11.220
B 41

NY

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 561—2002

# 动物炭疽诊断技术

## Diagnostic techniques for animal anthrax

2002-08-27 发布　　2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部　发布

# 前　言

炭疽是由炭疽杆菌所致的人畜共患烈性传染病，对反刍动物危害尤为严重。本病分布于世界各地，目前很多国家和地区仍有本病的发生，我国个别地区也有散发。世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英)，Office Intentional des Epizootic(法)，OIE]将该病列为B类动物传染病，我国农业部将其规定为二类动物传染病。

本标准与OIE编著《哺乳动物、禽和蜜蜂A和B类疾病诊断试验和疫苗标准手册》(2000)中有关炭疽抗原的诊断技术基本一致。但该手册介绍的血清学试验，由于特异性和敏感性较差而未采用。本标准吸收了农业部1979年颁布的《皮张炭疽沉淀反应技术操作规程》和《荧光抗体检验鬃、毛、绒类炭疽杆菌操作规程》等部分内容，因此，在本标准实施之后，上述规程将自动废止。

本标准的附录A、附录B为规范性附录。

本标准由农业部畜牧兽医局提出。

本标准由全国动物检疫标准化委员会归口。

本标准起草单位：中国人民解放军军需大学。

本标准主要起草人：王世若、王兴龙、沈广、韩文瑜、梁焕春。

# 动物炭疽诊断技术

## 1 范围

本标准规定了动物炭疽杆菌分离培养鉴定及血清学试验方法。

本标准适用于各种动物炭疽病的诊断及检疫。

## 2 新鲜疑似炭疽病料标本的细菌学检查

### 2.1 显微镜检查

#### 2.1.1 材料准备

##### 2.1.1.1 器材

恒温箱、显微镜、高压灭菌器、煮沸消毒器、漏斗、15 mm×150 mm 试管、最小反应管、移液管、带胶乳头的毛细吸管(或血清加样器)、乳钵、中性石棉、5 mL 注射器、外科刀、镊、铂金耳、酒精灯等。

##### 2.1.1.2 培养基

戊烷脒多粘菌素血液琼脂平板、碳酸氢钠琼脂平板、快速增殖肉汤、普通营养肉汤、普通营养琼脂平板、2%绵羊血液琼脂平板、2%兔血清琼脂平板等,配制方法见附录 A。

##### 2.1.1.3 试剂

炭疽沉淀素血清、阴性血清、标准炭疽杆菌抗原、炭疽荧光抗体、炭疽噬菌体。

##### 2.1.1.4 溶液及染色液

克氏固定液、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、缓冲甘油、0.5%苯酚(俗名石炭酸)溶液、福尔马林龙胆紫染色液、碱性美蓝染色液、革兰氏染色液,配方见附录 B。

##### 2.1.1.5 实验动物

体重 17 g～20 g 清洁级昆明系小鼠。

#### 2.1.2 病料标本采集

疑为炭疽动物,除慢性者外,其他不论是最急性者或急性者均于生前将耳部消毒后取血液,病变部取水肿液或渗出液等直接涂于载玻片上,自然干燥后,将玻片涂面相对叠好,中间用火柴杆隔开,以线捆扎,外用塑料纸包好。或用灭菌脱脂棉、滤纸、布片吸取血液等放于小试管中,待检。

死后,自消毒的耳根部或四肢末端部采取血液滴于玻片上;或用细绳在耳根部紧扎两道,在两绳之间将耳割下,以 5%苯酚溶液(见第 B.8 章)浸湿的棉布包好,放广口瓶中待检,耳切口处用烧红的烙铁烧灼止血。已经错剖的疑似炭疽动物尸体,可取肝、脾、肾等脏器置于试管中,待检。

上述涂片自然干燥,火焰固定,如涂片较薄,也可用无水甲醇或乙醇固定,然后用下述染色法染色镜检。

#### 2.1.3 雷比格尔(Rabiger)氏荚膜染色法

##### 2.1.3.1 操作方法

滴加 0.5 mL～1.0 mL 福尔马林龙胆紫染色液(见第 B.5 章)于涂抹面上,染色2 s～5 s,水洗(冲洗水用次氯酸盐溶液消毒,余同)、干燥、镜检。

##### 2.1.3.2 结果观察

粗大菌体呈竹节状排列,染成深紫色,菌体周围的荚膜染成淡紫色。

2.1.4 碱性美蓝染色法

2.1.4.1 操作方法

滴加 0.5 mL～1.0 mL 碱性美蓝染色液(见第 B.6 章)于涂抹面上,染色 2 min～3 min,水洗、干燥、镜检。

2.1.4.2 结果观察

粗大菌体呈竹节状排列,染成深蓝色,菌体周围的荚膜染成粉红色。也可用 3%沙黄染色液染色 3 min～5 min,菌体染成红色,菌体周围的荚膜染成黄色。

如观察到以上形态特征的杆菌,可初步确定为炭疽杆菌。

2.1.5 荧光抗体染色法

2.1.5.1 取样,涂片

以无菌手续采取可疑病变组织、水肿液、血液或渗出液等材料制成涂片标本,待检。

2.1.5.2 染色方法

染色方法如下:

a) 将制备好的涂抹玻片,自然干燥。

b) 将玻片投入克氏固定液内,固定 15 min,再经 95%酒精略加漂洗,自然干燥。

c) 滴加炭疽荧光抗体血清(见 2.1.1.3)0.5 mL～1.0 mL 浸没涂片,放湿盒内,室温孵育 20 min～30 min。

d) 用磷酸盐缓冲盐水(PBS)(见第 B.2 章)冲去荧光抗体,并于同一磷酸盐缓冲盐水内浸泡 3 min～5 min,再经蒸馏水略加漂洗,自然干燥。

e) 加适量缓冲甘油(见第 B.3 章),封片,荧光显微镜检查。

2.1.5.3 检查结果

卌:菌体周围的荚膜肥厚,发闪亮的黄绿色荧光,中央菌体呈明显或不明显的橙红色。

卅:菌体周围的荚膜肥厚,发明亮的黄绿色荧光,中央菌体呈明显或不明显的橙红色。

卄:菌体周围的荚膜肥厚,发较弱的黄绿色荧光,中央菌体呈明显或不明显的橙红色。

十:荚膜不显著,黄绿色荧光暗淡,中央菌体呈明显或不明显的橙红色。

一:无黄绿色荧光。

荧光反应在"卄"号以上者,报告发现了炭疽杆菌。

2.2 分离培养检查

炭疽杆菌的培养性状具有特征性,是确诊的重要依据之一,但病畜病程短,故分离培养检查主要用于动物死后新鲜标本的检验。

2.2.1 操作方法

用铂金耳钓取血液、水肿液、渗出物等,直接涂于平板培养基表面;脏器标本应切成几个不同的断面,压印于平板表面上,置 37℃恒温箱中孵育 18 h～24 h。

2.2.2 培养结果

如观察到以下特征的菌落,符合炭疽杆菌的特征。

a) 普通营养琼脂平板(见第 A.5 章)形成扁平、灰白色、毛玻璃样、粗糙、表面干燥、边缘不整齐、直径约 3 mm～5 mm 的火焰状大菌落。用低倍显微镜观察菌落边缘,呈卷发状。培养物有粘性,用铂金耳钓取,可拉成长丝,称为"拉丝状"现象。

b) 2%绵羊血液琼脂平板(见第 A.1 章)菌落周围不溶血,超过 24 h,发生轻度不完全溶血。

c) 戊烷脒多粘菌素血液琼脂平板(见第 A.1 章)其他需氧芽胞杆菌不生长,但炭疽杆菌生长,仅受轻度抑制,且菌落生长缓慢,于 15 h～24 h,形成较小的毛玻璃样粗糙的菌落,其边缘仍保持卷发状,不溶血。

2.3 分离的可疑菌株鉴定

用铂金耳钓取可疑菌落接种于普通营养肉汤中(见第 A.4 章)增菌,在 37℃水浴箱中孵育 4 h～

5 h，再钓菌进行下述形态特征、培养特性及抗原性鉴定。

2.3.1 **形态特征**

2.3.1.1 革兰氏染色(见第 B.7 章)镜检。

2.3.1.2 检查结果：见到粗大菌体，长 3 μm～5 μm，宽 0.1 μm～1.2 μm，中央椭圆形芽胞，长链条排列，两菌接触端如刀切状，革兰氏阳性。可判为炭疽杆菌。

2.3.2 **培养特性**

2.3.2.1 **普通营养肉汤**

管底有白色棉絮状沉淀物，培养液澄清，轻摇试管，沉淀物卷绕成团，往上升起，但不散失。

2.3.2.2 **青霉素串珠试验和青霉素抑制试验**

用铂金耳钓取待鉴定的培养物于 2%兔血清琼脂平板(见第 A.7 章)上，以灭菌的 L 形曲玻璃棒将菌液在平板表面上涂匀，用小镊子夹取浸有每毫升含 50 IU～100 IU 青霉素直径 6 mm 小纸片，贴于平板培养基中央，置 37℃恒温箱中孵育 3 h～4 h，取出，打开平皿盖，平放在显微镜载物台上，用低倍及高倍显微镜观察。

由于青霉素向外扩散，炭疽杆菌出现的反应分三层：内层——青霉素浓度较高，炭疽杆菌的生长受抑制，不生长，其他需氧芽胞杆菌仍能生长；中层——青霉素浓度适宜，呈链条状排列的炭疽杆菌菌体膨胀，形成串珠状，其他需氧芽胞杆菌不形成串珠状；外层——青霉素浓度太低，炭疽杆菌生长，仍呈链条状。观察完毕，继续孵育 8 h～12 h，测量纸片周围抑菌圈的大小，炭疽杆菌一般为 20 mm 左右，其他需氧芽胞杆菌无抑菌圈。

2.3.2.3 **荚膜形成试验**

用铂金耳钓取待检培养物接种于碳酸氢钠琼脂平板(见第 A.2 章)上，置 20%二氧化碳条件下(如烛缸中)，于 37℃恒温箱中孵育 5 h～24 h。强毒炭疽杆菌能产生大量的谷氨酸物质，在菌体周围生出荚膜，菌落呈 M(黏液)型。

2.3.2.4 **噬菌体裂解试验**

用铂金耳钓取普通营养肉汤培养物或制备的标本乳剂涂于普通营养琼脂平板上，使涂抹面成圆形，干燥后，用铂金耳钓取炭疽噬菌体(见 2.1.1.3)一满环，点种于圆形培养物的中央，置 37℃恒温箱中孵育 3 h～5 h。

在培养物中央出现明显而清亮的噬菌斑者，为裂解阳性反应，如在培养物中不出现或只出现不明显的斑点者，为阴性反应。为防止判定错误，可将培养时间延长到 18 h，再观察一次即可确定。其他需氧芽胞杆菌不出现特异的噬菌斑。

2.3.3 **抗原性鉴定(沉淀试验)**

2.3.3.1 **沉淀原制备**

取装有待鉴定的普通营养肉汤培养物的试管，置水浴锅中煮沸 15 min～30 min，取出冷却后，用中性石棉滤过，获得的透明液即为待检沉淀原。

2.3.3.2 **本试验的操作方法**

用毛细吸管吸取炭疽沉淀素血清(见 2.1.1.3)0.1 mL，徐徐注入斜置的最小反应管内，达到管的三分之一处，然后用另一支毛细吸管吸取待检的沉淀原沿反应管壁慢慢加到沉淀素血清的上面，达到管的三分之二高处，随即将斜置的反应管立起，置室温下待判定。

2.3.3.3 **对照试验**

实施本试验前，应做炭疽沉淀素血清对标准炭疽菌粉抗原和 0.5%苯酚生理盐水，及阴性血清对标准炭疽菌粉抗原等项对照试验，具体参照 5.4.2。

2.3.3.4 **结果判定**

阳性反应者在 1 min～5 min 内于两液面的交界处出现清晰、致密如线的白色沉淀环。其他判定标准与 5.5 中的 b)、c)和 d)相同。

### 2.4 小鼠接种试验

将病料标本用生理盐水做成 1∶5 乳剂给 3 只小鼠(见 3.1.1.5)各皮下注射 0.05 mL～0.1 mL。小鼠通常在注射后的 24 h～26 h 因败血症死亡。然后按 2.1 和 2.2 要求做检查。

### 2.5 细菌学检查的综合报告

病料染色标本镜下观察到呈竹节状有荚膜的单在短链条排列的大杆菌;培养物染色标本镜下观察到长链条排列的,有中央芽胞的大杆菌,革兰氏阳性,可初步报告为炭疽杆菌。培养物在普通营养肉汤中呈棉絮状生长,上液透明;平板上形成火焰状大菌落;不溶血;串珠试验及噬菌体裂解试验阳性,可报告检出炭疽杆菌。根据特殊需要所做的青霉素抑制试验,如果炭疽杆菌被青霉素抑制不生长时,可报告为青霉素敏感株。在二氧化碳($CO_2$)条件下培养,形成黏液型菌落,涂片染色镜检,观察到有肥厚荚膜的粗大杆菌(可用以代替小鼠接种试验),可报告检出了炭疽杆菌强毒株。

## 3 腐败、陈旧脏器、尸体炭疽杆菌的检查

腐败、陈旧脏器及尸体标本的检查按 2.3.3 项沉淀试验实施检查和判定结果。

## 4 鬃、毛、绒类中炭疽杆菌的检查

### 4.1 取样

用灭菌棉拭子蘸灭菌生理盐水涂擦采取样品时,应从里到外、从上到下、从左到右,尽量涂擦采取完全。然后置灭菌试管中待检。

### 4.2 分离培养

4.2.1 每支棉拭子各涂一个戊烷脒多粘菌素血液琼脂平板和一个碳酸氢钠琼脂平板。将戊烷脒多粘菌素血液琼脂平板放于普通温箱内;碳酸氢钠琼脂平板放于含 20%二氧化碳培养箱内(如烛缸)。二者均于 37℃培养 18 h～24 h。

4.2.2 如于戊烷脒多粘菌素血液琼脂平板上发现可疑菌落时,挑取培养物接种一支快速增殖肉汤管,于 37℃水浴培养 3 h～4 h,做革兰氏染色检查,或按 2.1.5 作荧光抗体染色检查。

4.2.3 如于碳酸氢钠琼脂平板上发现可疑的黏液型菌落时,挑取培养物按 2.1.3 或 2.1.4 方法作荚膜染色检查。

4.2.4 结果判定:按 2.1.3～2.1.5 和 2.3.1 规定判定结果。

## 5 皮张标本炭疽的沉淀试验检查

### 5.1 取样

5.1.1 在每张皮的腿部或腋下边缘部位,剪取样皮一块约 1.0 g。复检时,仍在第一次取样的附近部位采取样皮一块约 2 g,供作检验材料。

5.1.2 样皮应装入特制的布袋内(也可用其他容器),每袋应制成 100 小格,并编成 1～100 个袋号(称百格袋),按其取样顺序,将样皮依次装入小格袋内,皮张号、样皮号与袋格号应一致,逐将样皮袋严密包装送往消毒室,并附以送检单,格式见表 1。

**表 1 炭疽沉淀试验样皮送检单**

报检号:

| | |
|---|---|
| 送检单位: | 地址: |
| 样皮名称: | 数量: |
| 来源地: | 存放地: |
| 采样日期: | 受理日期: |
| 起止号码: | |
| 报检机关兽医: 签印: 年 月 日 | |

5.1.3 皮垛的编号，应与装样皮的布袋号相一致。盐皮、鲜皮及冻皮，应分开取样，不得混掺。

5.1.4 取样完毕的皮张，在未收到检疫结果通知单前，应保持原状，不得重新分类、包装、加工和移动。

5.1.5 取样人员，应进行炭疽预防注射和具有一定的防疫知识。在工作前，应穿好防护服，工作后，应充分消毒洗手，工作服须进行 103.41 kPa 高压蒸汽灭菌，要严格遵守防疫卫生制度。

5.1.6 每次取样时，兽医检疫人员，应在现场负责指导监督。

**5.2 消毒**

5.2.1 收到样皮后，应按送检单内容进行登记。

5.2.2 检查无误后，将样皮袋放入高压蒸汽灭菌器内，使压力升到 103.41 kPa，保持 30 min。

5.2.3 干皮与湿皮应分别消毒，如一次灭菌，干皮放上边，湿皮放下边，但湿皮、鲜皮和冻皮，于灭菌前应在 37℃～38℃恒温箱中放置 48 h，或放室温 3 d～4 d，令其干燥后，再进行消毒灭菌。

5.2.4 在操作中，应按检验炭疽病的防疫要求，不得污染周围环境和物品，用后的器械物品应及时消毒处理。

**5.3 被检皮张抗原的制备**

5.3.1 将清洁干燥的容瓶，放在木盘中，排成五列(或 10 列)，每列 10 只，每盘 50 瓶(或 100 瓶)，经灭菌后，修剪除去脂肪的样皮，按规定的质量，每两张装入 1 个容瓶中，自左起第一排第 1 瓶放 1～2 号，第 10 瓶放 19～20 号，其余类推，第五排第 50 瓶放 99～100 号皮样，容瓶位置，不得混乱，第 1 瓶和第 50 瓶应作记号。

5.3.2 如有缺皮或样皮混乱时，须将相应的容瓶翻扣起来，以免错号。

5.3.3 装样皮的木盘编号与样皮袋号应一致，同时将编号卡片放在木盘外侧的号夹中不得遗失。

5.3.4 按 1∶10 的比例将浸皮液(0.5%苯酚生理盐水)逐瓶加入 20 mL，在 10℃～20℃室温的条件下，浸泡 16 h～25 h，也可在 8℃～14℃水浴中浸泡 14 h～20 h。

5.3.5 取清洁无污的容瓶与漏斗(每漏斗放入叠好的中性滤纸)，每 10 个为一排排好，每盘五排计 50 个，其各个编号应与样皮木盘各个编号相对应。然后对号滤过，应使皮张抗原滤到澄清透明为止。

5.3.6 将滤过透明之皮张抗原木盘编号卡片，放在木盘外侧的号夹中，不得丢失。

**5.4 炭疽沉淀试验操作方法**

5.4.1 本试验须在 15℃～20℃以上的室温下进行。

5.4.2 实施本试验前须按下列要求，做对照试验：

a) 炭疽沉淀素血清对 1∶5 000 倍标准炭疽菌粉抗原，在 1 min 内应呈标准阳性反应。对已知阳性皮张抗原经 15 min 应呈阳性反应。

b) 炭疽沉淀素血清，对已知阴性皮张抗原和 0.5%苯酚生理盐水作用 15 min，应呈阴性反应。

c) 阴性血清对 1∶5 000 倍标准炭疽菌粉抗原和已知阳性皮张抗原经 15 min，应呈阴性反应。

5.4.3 本试验(初检)将反应管按皮张抗原木盘内的编号顺序排好，用血清加样器(或带胶乳头的毛细吸管)向反应管内加注炭疽沉淀素血清 0.1 mL～0.2 mL。然后用抗原加注器，吸取等量的皮张抗原，沿反应管壁徐徐加入，并记录加完后的时间，按加完的时间顺序排好，待判。

5.4.4 血清与皮张抗原的接触面，界限清晰，明显可见，界限不清者应重做。血清和抗原加注器(或带胶乳头的毛细吸管)应以 0.5%苯酚生理盐水充分彻底洗涤后，方可继续使用。

5.4.5 如为盐皮抗原，应在炭疽沉淀素血清中加入 4%化学纯氯化钠后，方能做血清反应。

**5.5 检查结果**

判定时，左手取出木盘中的装有 10 只反应管的木条，然后将反应管置于水槽中蘸水取出，放于眼睛平行位置，右手持黑色板衬于反应管的后面，在光线充足处进行观察与判定。须按下列标准记录结果：

a) “＋”：抗原与血清接触后，经 15 min 在两液接触面处，出现致密、清晰明显的白环为阳性反应。

b) “±”：白环模糊，不明显者为疑似反应。

c）“--”：两液接触面清晰，无白环者为阴性反应。

d）“()”：两液接触面界限不清，或其他原因不能判定者为无结果。

对可疑和无结果者，须重做一次。

5.6 **复检**

5.6.1 病皮复检时，应单张检验。初检呈阳性和疑似的材料，须重新对同一浸泡瓶的两个皮张号取样复检。复检时，应使用2～3个血清效价与初检血清效价相近的不同批号的沉淀素血清来进行，同时用阴性血清做对照。复检的方法同初检。

5.6.2 复检材料呈阳性反应时，则判为炭疽沉淀试验阳性。复检再呈疑似反应时，须按阳性处理。

5.6.3 经确定某号为阳性病皮后，应将病皮及上下相邻之污染皮，准确的挑出，均作病皮处理，并盖病皮戳印，保管于专用库或指定地方隔离。病皮、污染皮未经消毒，不得作合格皮处理。

5.6.4 皮张检疫结束后，应将结果填入检疫簿中，并开检验结果通知单，格式见表2。

**表2 检验结果通知单**

第　　号

| 反应类别 | 张　数 | 号　码 | |
|---|---|---|---|
| 阳　性 | | | |
| 疑　似 | | | |
| 阴　性 | | 备注 | |
| 合　计 | | | |

检疫机关：　　兽医检验员：

5.6.5 以有效方法对病皮进行消毒后，并经效果鉴定合格者，方能投入生产加工应用。

# 附 录 A
（规范性附录）
培养基的制备

## A.1 戊烷脒多粘菌素血液琼脂平板

### A.1.1 成分

| | |
|---|---|
| 牛肉膏 | 5 g |
| 蛋白胨 | 20 g |
| 氯化钠 | 5 g |
| 琼脂 | 20 g |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |
| 戊烷脒 | 最终浓度 $1.5\times10^{-4}$～$4\times10^{-4}$ g |
| 多粘菌素 | 最终浓度 3 IU/mL～10 IU/mL |
| 绵羊血液 | 20 mL |

### A.1.2 制法

按常规方法制备琼脂培养基，待冷至 45℃～50℃时，加入稀释的戊烷脒和多粘菌素，最后加入绵羊血液，混匀后，倾入平皿，制成平板。

## A.2 碳酸氢钠琼脂平板

### A.2.1 成分

| | |
|---|---|
| 牛肉膏 | 5 g |
| 蛋白胨 | 20 g |
| 氯化钠 | 5 g |
| 细炭末 | 2 g |
| 琼脂 | 20 g |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |
| 碳酸氢钠($NaHCO_3$) | 12 g |

### A.2.2 制法

先按常规方法制备含炭末琼脂培养基，待冷至 50℃左右时，加入碳酸氢钠，混匀后，倾入平皿，制成平板。

## A.3 快速增殖肉汤

### A.3.1 成分

| | |
|---|---|
| 牛肉膏 | 0.5 g |
| 蛋白胨 | 1.5 g |
| 酵母浸膏 | 0.3 g |
| 葡萄糖 | 0.5 g |
| 硫酸锰(0.001 mol/L) | 0.2 mL |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |

### A.3.2 制法

将以上成分加入蒸馏水内，加热溶解，调整 pH 值至 7.6，分装试管，每管约 1 mL，以 55 kPa 高压蒸

汽 15 min 灭菌，置冷水中迅速冷却。

### A.4 普通营养肉汤

#### A.4.1 成分

| | |
|---|---|
| 牛肉水 | 1 000 mL |
| 蛋白胨 | 10 g |
| 氯化钠(NaCl) | 5 g |

#### A.4.2 制法

将蛋白胨和氯化钠加入牛肉水中，放流通蒸气锅内加温溶解 30 min，用 0.4%氢氧化钠修正 pH 值为 7.4～7.6，置流通蒸气锅内加热 30 min，使碱溶解，用滤纸过滤，除去沉淀物，分装于试管三分之一处。以 103 kPa 高压蒸汽灭菌。

### A.5 普通营养琼脂平板

#### A.5.1 成分

| | |
|---|---|
| 普通营养肉汤(pH 值 7.4～7.6) | 100 mL |
| 琼脂粉 | 2 g～3 g |

#### A.5.2 制法

将琼脂粉加入普通肉汤中，加温溶解，用 0.4%氢氧化钠调整 pH 值为 7.2～7.4，加温使碱溶解，过滤，除沉淀物，以 103 kPa 高压蒸汽锅灭菌后，倾入平皿，制成平板。

### A.6 2%绵羊血液琼脂平板

#### A.6.1 成分

| | |
|---|---|
| 普通营养琼脂 | 100 mL |
| 脱纤维绵羊血液 | 2 mL |

#### A.6.2 制法

将普通琼脂加热溶化后，冷至 53℃左右，灭菌加入血液，混匀后，倾入平皿，制成平板。

### A.7 2%兔血清琼脂平板

#### A.7.1 成分

| | |
|---|---|
| 普通营养琼脂 | 100 mL |
| 兔血清 | 2 mL |

#### A.7.2 制法

将普通营养琼脂加热溶化，冷至 53℃左右，加灭菌血清，混匀后，倾入平皿，制成平板。

# 附　录　B
（规范性附录）
溶液、染色液配制方法

## B.1　克氏固定液

| | |
|---|---|
| 无水乙醇 | 6 份 |
| 三氯甲烷 | 3 份 |
| 甲醛溶液 | 1 份 |

三种成分混匀后，置密闭容器内，冷暗处贮存。

## B.2　磷酸盐缓冲盐水(PBS)

| | |
|---|---|
| 氯化钠(NaCl) | 8.0 g |
| 氯化钾(KCl) | 0.2 g |
| 磷酸二氢钾($KH_2PO_4$) | 0.2 g |
| 磷酸氢二钠($Na_2HPO_4$) | 1.15 g |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |

各成分加于蒸馏水内溶解后，另加硫酸镁、氯化钙和硫柳汞各 0.1 g 即成。

## B.3　缓冲甘油

| | |
|---|---|
| 优级纯甘油 | 9 份 |
| 碳酸盐缓冲液 | 1 份 |

混匀即成。

（碳酸盐缓冲液配方：0.5 mol/L 碳酸钠 1 份，加 0.5 mol/L 碳酸氢钠 3 份，混合而成）

## B.4　0.5％苯酚生理盐水

| | |
|---|---|
| 0.85％生理盐水 | 100 mL |
| 苯酚 | 0.5 g |

## B.5　福尔马林龙胆紫染色液

| | |
|---|---|
| 龙胆紫 | 3 g |
| 福尔马林 | 100 mL |

将龙胆紫加入福尔马林中混合过夜，用滤纸过滤，贮于棕色瓶中。

## B.6　碱性美蓝染色液

| | |
|---|---|
| 2％美蓝酒精液 | 3 mL |
| 1％氢氧化钾溶液 | 0.1 mL |
| 蒸馏水 | 10 mL |

将美蓝溶液和氢氧化钾溶液依次加入蒸馏水中后，混匀，滤纸过滤，贮于棕色瓶中。

### B.7 革兰氏染色液

#### B.7.1 草酸铵结晶紫液

| | |
|---|---|
| 10%结晶紫酒精液 | 10 mL |
| 10%草酸铵溶液 | 40 mL |

混匀后，滤纸过滤，贮于棕色瓶中。

#### B.7.2 鲁格氏液

| | |
|---|---|
| 碘片 | 1 g |
| 碘化钾 | 2 g |
| 蒸馏水 | 300 mL |

将碘化钾加入 30 mL 蒸馏水中，待完全溶解后，再将碘加入，最后加入蒸馏水，使全量为 300 mL 即可。

#### B.7.3 苯酚复红液

| | |
|---|---|
| 10%碳酸复红液 | 1 mL |
| 5%苯酚溶液 | 9 mL |

混合后，用滤纸过滤，贮于褐色瓶中。

#### B.7.4 10倍稀释苯酚的复红液

| | |
|---|---|
| 苯酚复红液 | 1 mL |
| 蒸馏水 | 9 mL |

混合后，贮于棕色瓶中。

#### B.7.5 革兰氏染色法

涂抹，干燥，火焰固定，草酸铵结晶液染色 2 min～3 min，水洗，鲁格氏液媒染 1 min～2 min，水洗，95%酒精染色 3 s～8 s，水洗，10 倍稀释苯酚复红液染色 1 min～2 min，水洗，干燥，镜检。

### B.8 5%苯酚溶液

| | |
|---|---|
| 苯酚 | 5 g |
| 蒸馏水 | 100 mL |

混匀即可。