

猪喘气病病原的分离鉴定

西北农学院 猪喘气病教研组

猪喘气病是猪的一种慢性呼吸道传染病。国外叫“猪地方性肺炎(EPP)”或“猪支原体肺炎(MPS)”。本病流行很广,世界各地均有报导,在我国和我省也很普遍,严重影响着养猪业的发展,特别是对机械化养猪业发展危害很大。本病的研究是国内外重点科研项目之一。经历半个多世纪的研究,国内外的兽医工作者都证明,猪喘气病的病原是一种支原体,并命名为猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*或*M. suis pneumoniae*)。为了证实我省猪喘气病的病原,并摸索其生长规律,为今后诊断和免疫的研究创造条件,我们于1978年进行了猪喘气病病原的分离和鉴定。现将研究结果报导如下。

材 料 和 方 法

一、培养基

1. 液体培养基 我们用的是改进的复合培养基,其成分如下:

Hank's液	44.5毫升
5%水解乳蛋白	2.5毫升
Hartley's牛心汤	30.0毫升
健康猪血清	20.0毫升
新鲜酵母浸液	2.0毫升
1.25%醋酸铊	1.0毫升
青霉素	500单位/毫升

用1 N氢氧化钠调至pH 7.6~7.8,每管分装4.5毫升,普通冰箱保存备用。

2. 固体培养基 在上述液体培养基中加入0.9%的纯化琼脂即可。

二、试验猪的选择

试验猪选自本院无喘气病猪群的健康断奶仔猪,品种为盘克和杂种,体重15~30市斤。经隔离观察,无咳嗽和喘气症状,经X-线胸透检查肺部无可疑阴影者为合格。

三、病料的来源与采集

从发病猪场挑选喘气症状明显的病猪,或经X-线胸透肺部有明显病变的病猪,放血致死,无菌操作采取有猪喘气病特征病变和健肺交界处的肺组织块,供分离培养。同时用病料感染猪,方法是将病肺组织块用液体培养基制成1:10悬液,静置或离心,取上

参加本项研究工作的有:李建强、张国祥、刘玉年、刘安典、张琼瑶、韩松林、薛登民、张守信。

清液，每头猪气管注射5毫升，滴鼻3毫升，或单独滴鼻5毫升。感染后每周X-线胸透检查，发现肺部有明显阴影，判断为“++”时（一般为感染后3周左右）放血致死，采取病料进行分离培养。

四、分离培养

1. 液体培养 采用病肺块浸泡法。将病料剪成芝麻大的颗粒，放入带象皮塞的液体培养基中，每管放入8~10粒，每份病料接种二管，置37℃培养，每天观察培养基的PH变化，将PH明显变酸（即PH由7.6降至7.0~6.8）的培养物，以1:5接种量传代，以后用1:10接种量，间隔4~5天盲目传代一次，通常传至6~7代，即可出现PH规律性下降，此时，取培养物涂片染色，进行形态学观察或固体培养。若传至10代以上，放置2~3周，PH仍无变化者弃去。

2. 固体培养 采用厌气培养法。将多次传代PH降至6.9的液体培养物，取0.1毫升，滴于新制备的固体培养基上，放入干燥器内点燃蜡烛，封盖，在37℃下培养7~14天，进行菌落形态的观察。

试 验 结 果

从六份病料中分离出四株支原体，代号为A、B、E、F株。通过培养性状的观察和培养物回归猪体试验，其中E、F株培养物的培养性状，符合猪肺炎支原体的特点，回归猪体诱发了典型的猪喘气病，并从试验猪的肺组织中又分离出相同的培养物，证明E、F株为猪肺炎支原体，而A、B株不是猪肺炎支原体。

一、培养性状的观察

菌株	菌体形态与大小	菌落形态	培养基变酸
A	球状多见，两极状和环状少，大小为0.3~0.5微米	培养7天，可见菌落呈圆形、中央有乳头，边缘较薄。	24小时
B	多为球杆状，环状少见。	培养7天，菌落为圆形，呈“油煎蛋”外观，较A稍扁些	24小时
E	两极状、环状多，但球状少，大小介于0.17~0.87微米。	培养11天，菌落圆形，边缘整齐，表面隆起有颗粒。有的菌落中心有丝状团，平均大小172微米。	2~3天
F	环状、两极状、降落伞状、车轮状等，大小介于0.29~1.16微米。	同上	2~3天

二、致病性试验

组 别	接种物代数	接种途径与剂量	接种头数	潜伏期	发病头数
试 验 组	A	第 13 代 气管注射 5 毫升 滴鼻 3 毫升	3	21 天	2
	B	第 15 代 同 上	3	只观察 27 天	0
	E	第 9 代 滴鼻 5 毫升	3	27—35 天	3
	F	第 9 代 同 上	3	14—35 天	3
对 照 组	液体培养基	同 上	3		0

注 对照组观察45天以上未发病

讨 论

猪喘气病是由猪肺炎支原体引起的,有少数报导“猪鼻支原体”也可以诱发猪肺炎,因此,对每一分离物不仅要证明它是支原体,而且要证明它是那种支原体。鉴于目前条件,我们做了以下工作。

一、证明我们的分离物是支原体,其依据是:

1. 菌体形态的多形性。用 6 代以后的分离物涂片染色镜检,均可见到形态多种多样的微生物,如两极状、球状、环状、车轮状、降落伞状等。

2. 分离物对青霉素和醋酸铊有抵抗力。

3. 在固体培养基上形成典型的小菌落。有的菌落隆起,表面有颗粒;有的菌落中央有乳头突起,有的呈“油煎蛋”外观。

4. L 型细菌的排除。分离物在不含青霉素和醋酸铊培养基上连续传 5 代以上,未见还原为细菌。

5. 细菌检查为阴性。

二、根据对猪致病性和培养特性两方面,证明我们的分离物是猪肺炎支原体。

1. 分离物对猪有致病性,可诱发典型的猪地方性肺炎。

用 E、F 株第 9 代培养物 (pH 6.9 左右), 接种试验猪, 每头猪滴鼻感染 5 毫升。隔离观察出现了咳嗽和喘气, X-线透视肺部出现明显阴影, 剖检时在肺脏的心叶、尖叶、中间叶以及膈叶前下部有典型的猪喘气病肺炎病变;病理组织学检查符合猪地方性肺炎变化,并从病肺组织中又分离出猪肺炎支原体,对照组的 3 头健康。

2. 分离物的培养性状符合猪肺炎支原体的特点。

用 E、F 株 6 代以后的培养物 (pH 6.9) 涂片, 用瑞特氏染色镜检, 可见多形性的微生物。菌体形态多种多样, 以两极状和环状 (大环与小环) 为主, 球状少, 培养 2—3 天才能使液体培养基变酸。在固体培养基上, 形成微小的园形菌落, 边缘整齐, 表面隆起有颗粒, 有的菌落中心有丝状团, 但中央无乳头突起, 测量 10 个菌落, 最大 258 微米, 最小 90 微米, 平均大小为 172 微米, 这些均与猪肺炎支原体的培养性状相一致。

三、A 株支原体是从强毒感染的肺组织中分离到的, 从生长特性, 菌体形态、菌落形态上均与猪肺炎支原体不同, 但其 13 代培养物, 回归猪体试验, 诱发了轻度肺炎。A 株为何种支原体, 有待进一步证实。

B 株支原体, 不仅对猪无致病性, 其培养性状与猪肺炎支原体也完全不同, 为一株无致病力的杂支原体。

四、猪肺炎支原体对营养要求苛刻, 必须提供良好的培养基才能生长。通过分离培养, 说明我们所用的改进的复合培养基是一种良好的培养基, 它能供给猪肺炎支原体生长时所需要的营养。其新鲜酵母浸液, 菌种为啤酒酵母菌, 用葡萄糖酵母培养基制备的。Hartley's 牛心汤, 是用奶牛场刚出生的未吃初乳的公犊牛心制备的, 其生长滴度高, 可达 10^{-10} , 不仅原料容易取得, 而且也降低了成本。

小 结

一、通过 E、F 两株猪肺炎支原体的分离鉴定, 首次证实了我省猪喘气病或猪地方性肺炎的病原是猪肺炎支原体。

二、通过野外菌株的分离, 说明我们用的改进的复合培养基, 是一种良好的培养基。

参 考 文 献

1. 江苏农科院《猪喘气病研究资料汇编 (1958—1977)》1978.6
2. 上海农科院《猪地方性肺炎的病原和诊断》
3. Falln, R.J《Methods in Microbiology》vol.3B, 211—267, 1969
4. Whittlestone P, 《Advances in veterinary Science and Comparative medicine》vol.17, 1, 1973
5. Cruickshank《Medical microbiology》1965年出版
6. Furlong-S.L《Aust.vet.J.》Vol 51.No1.28—31 1975
7. Goodwin, R.W.《vet.Rec》vol.77.1247, 1965
8. Goodwin, R.F.W,《vet.Rec》vol.98 260—261, 1976

(注) 本研究承蒙农林部中监所、江苏农科院, 以及西北农学院医务所赵世江同志、兽医院杨必顺同志大力支持和帮助, 特此致谢。