

猪喘气病病原支原体的分离培养

上海农业科学院畜牧兽医研究所猪喘气病研究组

(上海)

我国有代表性的猪喘气病济南强毒株及 III 乳适应株, 均能用无细胞液体培养基分离传代。接种 3 天后, 培养基的 pH 从 7.5 下降到 6.9 左右, 产生轻微混浊。培养物呈多形态, 移种固体培养基能生成菌落。

不同代次的培养物均能使健康仔猪发生典型的猪喘气病肺炎。

根据培养物生长特征、形态、染色观察及抗青霉素和醋酸铊等特性, 确定为支原体; 高度稀释 (相当于原始接种材料的 10^{-11}) 的长期孵育传代 (最长 89 天) 培养物能诱发肺炎, 从实验感染猪的肺或肺门淋巴结能再分离到相同的支原体, 从而确定其为猪喘气病病原体。

猪喘气病病原微生物能通过阻留细菌的滤器, 不为青霉素和醋酸铊所抑制, 以及在常规的支原体培养基中不生长, 故近 20 年来, 国内外不少研究工作者曾认为它是一种病毒。从 1965 年起, 国外证实猪喘气病病原是猪肺炎支原体, 并指出其营养要求苛刻, 分离较困难。

确定猪喘气病病原对于诊断和防治是十分重要的。经过伟大的无产阶级文化大革命, 我们批判了修正主义科研路线, 以毛主席的光辉哲学思想为武器, 破除迷信, 解放思想, 对猪喘气病病原进行了分离培养。

分离培养

(一) 标本来源和处理

Z 株系 1960 年自农业部兽医生物药品监察所引进之济南强毒株。III 乳₈₀H₁₉系北京市农科所第 80 代 III 乳株 (由济南强毒株适应于乳兔) 引进后经仓鼠呼吸道传代之第 19 代。以上病原菌株接种健康猪均能诱发典型猪喘气病。L#1—L#16 系

从上海龙华屠宰场采集的病肺标本, 经肉眼观察病变典型无并发症者。崇明株系来自上海崇明县, 其原代病肺与第一代人工感染肺炎材料均作分离材料。

(二) 培养基

煮沸细胞培养基: 1—7 日龄健康乳猪肺制备埋块细胞 (细胞培养生长液: 系以 Earle's 液为基础, 加入 0.5% 乳蛋白水解物、15% 犊牛血清、每毫升含青霉素链霉素各 200 单位), 以上细胞培养 3—5 天时, 组织块周围即长出约 0.5 毫米宽的细胞层, 此时倾去生长液换为磷酸盐缓冲液, 经水浴煮沸 30 分钟, 倾去磷酸缓冲液加入 1.2—1.5 毫升营养液 (20% 灭活健康猪血清, 10% 含有 5% 乳蛋白水解物的 Hank's 液, 70% Hank's 液, 0.01% 酵母浸膏, 青霉素 200 单位/毫升, pH7.4) 即成煮沸细胞培养基, 储藏于 4℃ 中备用。在煮沸细胞培养基传至第 13 代时曾用没有细胞的同样培养基 (简称“双无”, 即无细胞无牛心汤) 进

本文于 1975 年 4 月 23 日收到。

行分离培养。

1. 无细胞液体培养基: 每 1000 毫升中含有下列成份: 牛心消化汤 300 毫升、含 1% 乳蛋白水解物的 Hank's 液 500 毫升、经灭活的无喘气病猪血清 200 毫升、酵母浸出汁 5 毫升、青霉素 20 万单位、醋酸铊 0.125 克。pH 7.4。分装于 2 × 5 厘米小管中, 每管 4.5 毫升。

2. 固体培养基: 上述液体培养基中加入 1% 琼脂。倾注平皿时培养基的厚度不超过 2 毫米对菌落观察有利。

(三) 分离结果

1. 煮沸细胞培养基: 以 III 乳₈₀ H₁₉ 诱致健康猪发病, 取其肺炎病灶及其邻近的健康组织制备埋块细胞, 培养 3 天以后, 吸取培养液 4 滴 (约 0.2 毫升) 接种煮沸细胞培养基, 并如上法继续传代。初为培养 4 天盲传 1 代, 第 6 代起 pH 下降, 并有少量沉

淀, 轻度混浊, 此后继续传代均在 pH 降至 6.9—7.0 时进行。共传 33 代。第 6、16、20、28 代培养物用肉汤、厌气肉汤及血琼脂平皿菌检均为阴性, 经回归猪体测定证明已适应生长, 第 13 代煮沸细胞培养物移种到“双无”培养基也能适应生长。

2. 无细胞液体培养基: 将煮沸细胞培养基第 17 代培养物接种猪 (*14) 及“双无”培养基第 4 代培养物接种猪 (*17*18) 之病肺组织制成 1:5 悬液, 用无细胞液体培养基进行分离培养, 每管接种 0.5 毫升。接种后当 pH 较对照管降低 0.5 左右时即收获传代。这些经过若干次人工培养的材料接种的发病猪, 其病肺悬液直接接种液体培养基极易繁殖传代, 曾分离 9 份标本, 全部获阳性结果。而济南强毒株、崇明强毒株 (均系猪体传代) 及仓鼠适应株人工接种发病猪的病肺悬液接种液体培养基则未获生长。将接种济南株强毒的病猪肺制备

表 1 适应株与非适应株病肺液体培养分离结果

株别	猪号	菌株来源	分离方法	通过代数	pH 值变化	培 养 结 果
适 应 株	*14	III 乳 ₈₀ H ₁₉ 煮 F ₁₇	悬液接种	28	+	12, 14, 15, 22, 23 代形态观察阳性
	*17 *18	III 乳 ₈₀ H ₁₉ 煮 F ₁₃ 无 F ₄	悬液接种	29	+	10, 11, 13, 14, 19, 21, 22 代形态观察阳性
	*24	ZPT ₂₄	悬液接种	10	+	污染停传
	*59	*17 *18 无 F ₆₋₇	悬液接种	17	+	4, 6, 9, 11 代形态观察阳性
	*62	*14 无 F ₂	悬液接种	17	+	6, 9, 11 代形态观察阳性
	*62 (淋巴)	*14 无 F ₂	悬液接种	20	+	5, 8, 10 代形态观察阳性
	*66 *67	*14 无 F ₂	悬液接种	17	+	1, 6, 9, 11 代形态观察阳性
	*103 *105	*17 *18 无 F ₁ , → *97	悬液接种	9	+	放弃
	*114	*17 *18 无 F ₄₆ 固, 无 F ₂	悬液接种	3	+	放弃
强 毒 株	*82	济 南 株	悬液接种	5	-	每代培养 3 周末生长丢弃
	*58	济南株仓鼠继代	悬液接种	2	-	每代培养 3 周末生长丢弃
	*51 *52	崇 明 株	悬液接种	2	-	每代培养 3 周末生长丢弃
	*8 *10	济 南 株	埋块培养 3 天再以培养液接种	19	+	5, 6 两代形态观察阳性 F ₁₀ 接种猪两头, 有典型病变。

埋块细胞培养孵育 3 天,使细胞与病原支原体在离体条件下共同生长繁殖,然后移种液体培养基即获得成功。其后的代次繁殖传代与适应株同样容易(表 1)。

3. 地方菌株分离: L*1—6 的分离是将肺块投入液体培养基浸泡, L*7—16 的分离是将病肺剪成 1—2 毫米之碎块,用无

细胞液体培养基洗涤一次,取其洗液为 A 管,所余组织块再加入无细胞液体培养基为 B 管,两管同时培养。崇明株的原代病肺及实验室人工感染第 1 代的病肺均同时做病肺埋块及肺块浸泡法培养,结果龙华屠宰场标本 6 份阳性,经形态学观察其中 L*9 呈现与 Z 株相同之多形性(表 2)。

表 2 分离到的地方菌株

标本来源	编 号	分 离 方 法	分 离 结 果		形 态 观 察	其 他
			移植代次	生长情况		
龙华屠宰场	L*6	病肺投入无细胞液体培养基	11	+	球状为主,少见环	F ₂ 回猪“土” F ₁₁ 冻干
龙华屠宰场	L*9	肺碎块用无细胞液体培养基洗 1 次,洗液为 A 组	8	+	环状,多形态	固体生成菌落回猪“+”
	L*11		5	+	球状,个别小环	
	L*13		5	+	球状,个别环状	固体生成菌落
	L*16		7	+	球状,少数双球状	固体生成菌落
龙华屠宰场	L*13	A 组吸取后沉淀之组织块加入无细胞液体培养基为 B 组	5	+		
	L*14		4	+	球状,个别小环	固体生成菌落

生长特征

形 态

1. 混浊度:支原体在无细胞液体培养基中生长,能产生轻微混浊及少量沉淀,轻轻摇动呈烟雾状上升。当培养基质量良好及生长茂盛时混浊度较为明显。

2. 滴度:济南强毒株无细胞培养第 19—23 代之间曾经过 5 次终末稀释移种,其滴度在 10^{-3} — 10^{-6} 之间。稀释度大的生长缓慢。

3. 在盖玻片上生长:按组织培养器皿之要求处理的盖玻片投入无细胞液体培养基中,然后接种病原支原体,在培养基 pH 降到 6.8 左右时取出观察,显示了有附着在盖玻片上生长的特性。

4. 固体培养基上的生长:液体培养基中生长的病原支原体移种固体培养基,培养 3—4 天,能生成菌落。培养 9 天后菌落不再显著增大。

病原支原体以革兰氏染色显示极浅之阴性,染色效果差。液体培养物经离心 ($6260g$ 20—30 分钟) 取沉淀物制备涂片,也曾使用生长茂盛之培养物直接制备涂片,经固定后用格氏姬姆萨染色液染色 3 小时(或将染色缸置 $56^{\circ}C$ 水浴中染色 30 分钟),再经丙酮脱色 10 秒钟。在液体培养基中置入盖玻片,培养后取出,用竹签夹好,先经磷酸缓冲液洗涤,固定染色同上。病肺触片也以同法染色。

1. 液体培养物离心沉淀涂片及在液体培养基中置入的盖玻片上,见有清晰的多形性微生物,多呈球状、两极状、环状,以及带有中隔的“车轮状”。一般小环直径为 0.4 — 0.8 微米,大环为 3.6 微米,车轮状由 2.4 — 4.8 微米不等(图版 I-1、2)。最小的球形单体及丝状体用光学显微镜及目镜

测微器无法测量其大小。偶而还见过长链状或长链首尾相接形成所谓“项链状”。

9 份适应株标本在常规移植过程中曾进行多次盖玻片及沉淀涂片形态学观察。见到环状、半月状及大环（直径 10—20 微米）球状、双球状、逗点状等。有时在一份材料的某一代次中，以某几种形态为主，别的代次则不相同。12 份标本的一些代次，仅见或主要所见为球状或双球状。形态学上的差异与代次高低、培养期长短及 pH 间的关系尚未发现规律。

2. 在病肺触片中，见有球状、环状菌体，着色较浅，显微摄影效果不好。

3. 菌落形态：将 *17 *18 F₂₆, *66 *67 F₁₇ 移种固体培养基，培养 3—4 天，用低倍镜（6.3 × 10）观察能见微小菌落，恰能与琼脂中气泡、杂质相区别（图版 I-3）。培养 9 天时菌落直径平均达 200 微米。任选菌落 12 个测量大小结果是 47.6、166.6、214.2、261.8、119.0、190.4、238.0、261.8、166.6、190.4、238.0 和 289.4 微米。

一般放大镜能见露珠状菌落，低倍镜（2.5 × 10）观察可见菌落中央稍有隆起，无明显乳头状生长，表面粗糙边缘整齐，9

天后菌落不显著增大。

致病性

把不同代次的煮沸细胞及无细胞培养物接种健康仔猪，以观察其对猪的致病性。

试验猪的来源多数系本所健康猪场繁殖之 2—3 月龄土种杂交猪（梅山 × 枫泾）。少数系购自人民公社饲养场，经 X 光透视窝阴性的乳猪。试验猪饲养于墙高 1.2 米的猪舍内，各组用具严格分开。采用气管注射或滴鼻接种，每头剂量 5—8 毫升。依据 X 光透视或剖检判定结果。

煮沸细胞培养物：第 8 代、14 代、17 代、25 代、4 个代次回归猪体共 11 头（图 1）。均产生典型猪喘气病病变（图 2），其中第 25 代材料接种猪康复后，用济南强毒株攻击，全部保护，而 2 头强毒对照猪均产生典型猪喘气病病变。

“双无”培养物：煮沸细胞培养第 13 代材料移种“双无”培养基共传 25 代，均发生 pH 变化。将第 4 代和第 19 代培养物各接种猪 2 头（图 1），均产生典型猪喘气病病变（图 2）。

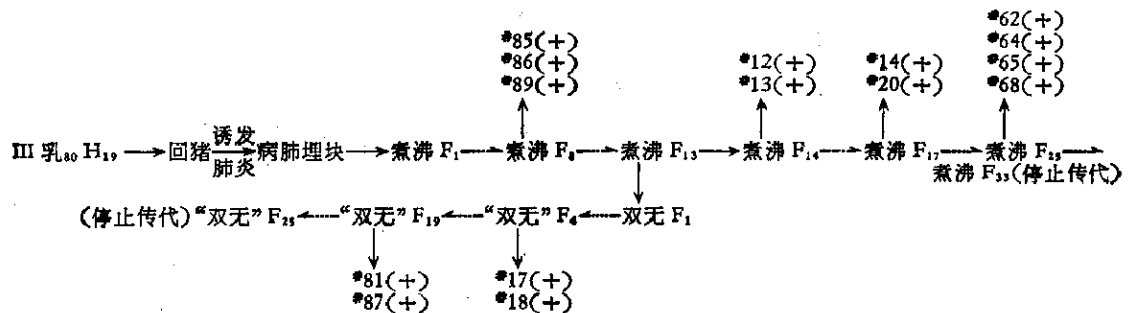


图 1 煮沸细胞及“双无”培养基分离传代及回归猪的示意

无细胞液体培养物：10 份标本共接种 22 头猪，产生典型猪喘气病病变的有 19 头（图 3），其中一头猪因腹泻曾以链霉素治疗予以剔除，阳性率为 90.48 %。液体

培养基中生长的支原体人工感染猪多数出现临床咳嗽。接种猪中 8 头的肺部病灶进行支原体再分离，结果全部阳性，肺门淋巴结仅分离一头也获阳性结果（表 3）。

接种材料	接 种 猪	
#17 #18 无F _{6,7}	#55	#59
	#62	#66
#14 无F ₆	#62	#67
	#93	#96
#14 无F ₁₀	#91	#92
	#94	#98
#17 #18 无F ₁₅	#91	#92
	#114	#118
#14 无F ₁₄	#132	#119
	#113	#116
#17 #18 无F ₂₆ → 固F ₁ —无F ₂	#102	#104
	#885	#889
#62 淋巴无F ₁₇		
#17 #18 无F ₂₆		
济南株无F ₁₀		

图 3 液体培养物接种猪肺部剖检

接种材料	肺 部 剖 检	
煮沸细胞 F ₈	#88	#89
	#13	#16
煮沸细胞 F ₁₄	#12	#13
	#14	#20
煮沸细胞 F ₁₇	#63	#64
	#65	#68
煮沸细胞 F ₂₅	#8	#10
	#17	#18
“双无”F ₄	#81	#87
	#86	#86
“双无”F ₁₉	#81	#87
	#86	#86

图 2 煮沸细胞及“双无”培养物接种猪肺部剖检

表 3 支原体培养物感染猪的结果

培养基类别	标 本	相当于原始代次的稀释度	37℃孵育总日数	接 种途 径	肺 炎产生	同 窝 健康猪肺炎产生	支原体再分离
煮沸细胞	煮 F ₈	10 ⁻⁷	34	气管	3/3	—	未 做
	煮 F ₁₄	10 ^{-12.25}	57	气管	2/2	0/1	未 做
	煮 F ₁₇	10 ^{-14.5}	68	气管	2/2	0/1	未 做
	煮 F ₂₅	10 ^{-21.87}	100	气管	4/4	—	未 做
“双无”	“双无” F ₄	10 ^{-14.5}	74	气管	2/2	0/1	未 做
	“双无” F ₁₉	10 ⁻²⁸	135	气管	2/2		未 做
无细胞液体培养基	*17 *18 F ₅₋₇	10 ⁻⁶	20	滴鼻	2/2	0/2	1/1
	*17 *18 F ₁₉	10 ⁻¹⁵	54	滴鼻	3/3	0/2	未 做
	*17 *18 F ₃₆	10 ⁻²⁶	89	滴鼻	2/2	0/2	2/2
	*17 *18 F ₂₆ 固.无 F ₂	10 ⁻²⁹		滴鼻	2/2	0/3	2/2
	*14 无 F ₂	10 ⁻⁸	35	滴鼻	3/3	0/2	3/3 ⁽¹⁾
	*14 F ₁₄₋₁₆	10 ⁻¹⁴	67	滴鼻	0/2	} 0/2	未 做
	*14 F ₁₀	10 ⁻¹⁰	43	滴鼻	2/2		未 做
	*66 *67 F ₁₆	10 ⁻¹⁶	58	滴鼻	2/2	} 0/3	未 做
	*62 淋巴 F ₁₇	10 ⁻¹⁷	62	滴鼻	1/2 ⁽²⁾		未 做
	Z*8 *10 F ₁₀	10 ⁻¹⁰	50	滴鼻	2/2	0/1	未 做

(1) 3头混合分离。(2) 其中一头接种后因腹泻以50万单位链霉素治疗过。

液体培养基中的支原体对猪的致病性可以循环。*14猪标本分离的支原体液体培养物于第8代接种3头猪(*66、*67、*62)，均产生典型的猪喘气病病变。从3头猪的肺部病灶中及*62猪的肺门淋巴结中能分离到相同的支原体，两株分离物在同样的液体培养基中分别传至17及16代，回归猪体仍有致病力。完成了二个循环。

人工接种发病猪的肺具有感染力，曾将*17 *18 F₁₅接种发病猪的肺悬液，滴鼻接种2头猪，接种后16天宰杀呈典型的猪喘气病病变。

结论与讨论

根据上述试验，证明我国有代表性的猪喘气病济南强毒株及III乳₉₀ H₁₉株系一种猪喘气病致病性支原体。确定其为支原体有如下的依据：(1)能在无细胞液体培养基中长期传代。(2)具有多形性显示它

缺乏坚硬的细胞壁。(3)革兰氏染色呈极浅之阴性而吉姆萨染料能使它良好着色。(4)在加有青霉素和醋酸铀的培养基中生长良好。(5)在固体培养基上能生成菌落。确定这种支原体即猪喘气病病原的依据如下：(1)菌株由猪喘气病病例分离所得。(2)长期孵育(最长89天)的高度稀释(相当于原始材料10⁻²⁹)培养物对猪仍有致病力。(3)实验感染猪的肺部病灶对健康猪具有感染力。(4)从实验感染猪的肺部病灶及肺门淋巴结中，再分离到的支原体其形态、培养特性及对猪的致病性与亲本相同。

关于猪肺炎支原体的分离报告大都提到这种微生物生长所需条件的严格^[1,2,5]。在常规的支原体培养基中不生长^[3,4]。因此可以认为,在近20年中,对猪喘气病病原概念混乱的原因,除了支原体与病毒均有可通过细菌滤器的共性以外,还因为没有找到一种可供满足其生长要求的培养基,而

仅需很少营养即能生长的猪呼吸道的其它支原体,常常干扰了对原发性病原的分离。本研究中所用的无细胞培养基除乳蛋白水解物外,均系国产原料制备,猪喘气病致病性支原体在其中生长茂盛。适应株分离时,用肺悬液接种即可生长,强毒猪肺或仓鼠适应株分离时宜先通过病肺埋块细胞培养再移种液体培养基。

有人主张初次分离需要在含 5—10% 二氧化碳大气中进行。我们使用带橡皮塞的玻璃管在通常大气中培养甚为简便有效。固体培养基须将平皿密封,生长良好。

已知猪的呼吸道往往存在一种以上支原体,在猪肺炎支原体培养基中均生长良好^[1],易干扰对原发性病原的分离。我们的实验中没有遇到这种麻烦,虽然我们的培养物未经克隆化,不能排除混杂有别种支原体,但终究没有遇到由于其他支原体生长超过猪喘气病致病性支原体而使培养物丧失诱致肺炎能力的情况。这可能由于我们所用的菌株系经实验室长期传代,比较纯,而我们应用无喘气病猪群的健康猪,呼吸道带支原体的机会极少,这不能说明自然病例的情况。采自龙华屠宰场的 6 株分离物中,5 株形态以球状为主,少见或偶见环状,仅 L *9 一株与 Z 株支原体的以环状为主的多形态相符,不能排除这 5 株形态学上与 Z 株的差异是由品种不同所造成^[6]。

软皮体纲微生物缺少坚硬的细胞壁,因而常呈各式各样的形态,故称之为“多形态微生物”。同一种支原体,因不同的培养基、发育阶段、标本制备方法亦呈现不同的形态^[7]。我们所见液体培养基中病原支原体的形态及大小相差悬殊,环状的直径可由 0.8 微米到 20 微米不等。尚不能确定环状体究系球形单体由细丝串连而成或是长大了的、边缘有浓染胞浆聚集的单细胞^[8],我们已把观察到环状体作为实验室常规检查的判断依据之一。为有利于诊断及免疫研究,有必要对形态学作进一步的观察。

参 考 资 料

- [1] Fallon, R. J. & Whittlestone, P.: *Methods in Microbiology*, 3B: 211—267, Academic press, London and New York, 1969.
- [2] Goodwin, R. F. W. & Hurrell, J. M.: *J. Hyg. Camb.*, 68: 313, 1970.
- [3] Goodwin, R. F. W., Pomeroy, A. P., Whittlestone, P.: *Vet. Rec.*, 77: 1247, 1965.
- [4] Goodwin, R. F. W., Pomeroy, A. P. & Whittlestone, P.: *J. Hyg. Camb.*, 65: 5, 1967.
- [5] Goodwin, R. F. W. & Whittlestone, P.: *Brit. J. Exp. Path.*, 47: 518, 1966.
- [6] L'Euey, C.: *Canad. J. Comp. Med.*, 30: 10, 1969.
- [7] Lemcke, R. M.: *J. Bact.*, 110: 1154, 1972.
- [8] Razin, S. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 143: 64, 1967.

THE ISOLATION AND CULTIVATION OF A MYCOPLASMA, THE CAUSATIVE AGENT OF ENZOOTIC PNEUMONIA OF SWINE

GROUP OF SWINE ENZOOTIC PNEUMONIA, INSTITUTE OF ANIMAL HUSBANDRY AND
VETERINARY MEDICINE, SHANGHAI ACADEMY OF AGRICULTURE
(Shanghai)

Both the Jinan virulent strain which is representative of the swine enzootic pneumonia in our country, and the suckling-rabbit adapted strain, number III, have been isolated and passed serially by means of cell-free liquid media. Three days after inoculation, the pH of the media, which became slightly turbid, lowered approximately from 7.5 to 6.9. The organism was noted with variations in morphology and with colony-formation after being transferred on solid media.

Isolates from different numbers of serial passages could invariably induce typical pneumonic lesions of swine enzootic pneumonia. The pathogenicity of the causative agent was found to be reproducible.

The pathogen in concern was identified as a mycoplasma in accordance with its growth characteristics and its morphological and staining nature, together with its resistance to penicillin and to thallous acetate. The lengthy period of incubation and serially-passaged-propagation, as long as 89 days, and the maximum, final dilution, calculated to be 10^{-29} of the original inoculum, that could still cause pneumonia, as well as the recovery of the same mycoplasma from the lung tissue, or its hilar lymph nodes, of the experimentally infected pigs have led us to assume that the mycoplasma is the causative agent of enzootic pneumonia of swine.