

猪呼吸道支原体溶血和产生过氧化氢活性测定*

周翠堤 陈嘉棣 张惠英 黎济申

(上海市农业科学院畜牧兽医研究所, 上海)

用红细胞美蓝着色试验和血琼脂覆盖技术测定猪呼吸道支原体产生过氧化氢和溶血活性,发现猪肺炎支原体 (*M. hyopneumoniae*) 定型菌种 NCTC 10110 以及 J、201 等品系和我国分离的血清学上证实为同种的 13 株均产生过氧化氢,具有溶血活性。对于测定技术、影响因素和猪肺炎支原体的致病因子进行了讨论。

Lind 首先报告用红细胞美蓝着色试验测定支原体产生过氧化氢活性^[1],发现猪鼻支原体 (*M. hyorhinis*) EF25 和莱氏非固醇原体 (*A. Laid lawii*) 均产生过氧化氢,具有溶血活性,因而提出红细胞美蓝着色试验可作为支原体分泌过氧化氢的快速而简明的测定方法。Johnson 等指出红细胞美蓝着色试验与检出过氧化氢的过氧化物酶抑制法和联苯胺血琼脂法完全相关,从而证实了 Lind 的结论^[2]。Pijoan 严格按照 Lind 所述方法证明猪鼻支原体的 5 个品系均产生过氧化氢,而猪肺炎支原体的 2 个品系和猪滑液支原体 (*M. hyosynoviae*) 则否,他建议红细胞美蓝着色试验作为混杂有猪鼻支原体和粒状非固醇原体 (*A. granularum*) 的培养物中,鉴定猪肺炎支原体菌落的方法^[3]。根据 Pijoan 和 Johnson 的报告, Farrington 等也将不产生过氧化氢作为鉴定猪肺炎支原体的生化指标^[4]。鉴于过氧化氢为支原体的致病因子之一,为明确美蓝红细胞着色试验在鉴别猪呼吸道支原体中的作用和探索猪肺炎支原体的致病因子而反复进行本试验。

材料和方法

(一) 菌种来源

1. 未定型菌株: 孝、双丰、无号、168、65 为江苏省农业科学院畜牧兽医研究所赠送。武 II₁₂、武 II₂₇、武 IV₁₀、武 IV₃₁ 由湖北省畜牧特产研究所赠送。夏 VIII、夏 XIII 由宁夏农科院畜牧兽医研究所赠送。LC、玉、由广西兽医研究所赠送。成 II 由四川省农科院畜牧兽医研究所赠送。Z 固、ZS、(三终)、ZS₃(三 G) 由本所分离。上述菌种系根据其致病性确定为猪喘气病病原支原体,未经血清学鉴定。L6、L6G3、L6G13 为我所分离的疑似猪鼻支原体。宁₁、宁₂ 为宁夏农学院分离和赠送的猪鼻支原体,是以对实验猪所诱致的病变为命名依据的,未经血清学鉴定。

2. 定型菌株: 丝状支原体丝状变种 (*M. mycoides* var. *mycoides*) C88、腐败毒支原体 (*M. gallisepticum*) S6、KP 由农业部兽医药品监察所 (以下简称中监所) 赠送。肺炎支原体 (*M. pneumoniae*) FH 由上海市卫生防疫站赠送。猪肺炎支原体 NCTC 10110 由 R. F. W. Goodwin 分离,中监所赠送。J 株由 R. F. W. Goodwin 分离,日本东京大学农学部尾形学教授赠送; 201 株由尾形学教授分离和赠送。猪鼻支原体 BTS-7 由 R. G. Witter 分离、猪滑液支原体 S16 由 R. F. Ross 分离,均由尾形学教授赠送。

本文于 1980 年 4 月 26 日收到。

* 衷心感谢日本东京大学农学部尾形学教授赠送猪肺炎支原体 J-201 株,猪鼻支原体 BTS-7 株,猪滑液支原体 S16 株,使我们的研究工作得以有效地进行。

(二) 菌种的核实

对大部份猪喘气病病原原体进行了形态学检查。对其中一部份进行致病性测定。用 ZS₂ 及 L6 株的家兔高免血清对全部支原体进行纸片生长抑制试验以确定种属。

(三) 培养基和培养环境

除 BTS-7、S16 株以外,各株均生长于牛心汤复合培养基中^[1],唯将其中 Hank 氏液所含的乳蛋白水解物按广西所介绍从 1% 降至 0.25%。上述液体培养基中加入 0.8% 自行纯化的琼脂或 Oxoid L28 琼脂制成固体培养基供测定溶血活性及过氧化氢之用。固体培养基中猪血清增至 30%。

BTS-7 和 S16 株在粘液素-精氨酸牛心汤中传种,培养基成份如下;含 0.5% 粘液素的牛心汤 70 毫升,5% 精氨酸 4 毫升,葡萄糖 0.5 克,未灭活马血清 20 毫升,25% 酵母浸液 5 毫升,2.5% 醋酸铀 1 毫升,青霉素 100 单位/毫升。加入 0.8% Oxoid L28 琼脂制成固体培养基。BTS-7 和 S16 的少数批次在这种固体培养基上测定溶血和产生过氧化氢活性,但多数批次仍在牛心汤复合琼脂培养基上进行。固体平皿放置于含 5% CO₂ 的潮湿大气中进行培养。

(四) 溶血试验

试剂和方法按文献[6]所述。测定前菌种在液体培养基中传 2 代使生长旺盛,然后按下法进行。

1. 取生长期固体培养物,选其密度适当,单个菌落发育良好的平皿作测定用。

2. 经高压灭菌的 Alsever 氏液中,采入等量绵羊血,摇匀,勿使凝固。

3. 1 份上述绵羊血加至 3 份 1% Alsever 氏琼脂中,倾注于待测平皿上(直径 7 厘米皿加入 1.5—1.8 毫升)。

4. 置于含 5% CO₂ 的密封容器中培养,48—96 小时判定结果。少数未出现溶血的标本,重新置于相同环境中培养,在羊红细胞自溶以前出现溶血圈的均作为阳性。

(五) 美蓝着色试验

按 Lind^[13] 所述稍加改变,美蓝在 pH 7.2 的 PBS 中配成 0.1% 溶液,保存于 4℃ 备用。新鲜豚鼠血,以等量 Alsever 氏液抗凝,用 pH 7.2 PBS

洗二次,取得红细胞,配成 0.5% 备用。

1. 切取生长期菌落发育丰满的琼脂块约 0.6×1 厘米,将菌落面向上放于载玻片上。

2. 用 pH 7.2 的 PBS 将 0.1% 美蓝稀释一倍,加入等量 0.5% 绵羊红细胞,于每块琼脂上滴一滴。

3. 置 37℃ 水浴箱内作用 20 分钟(如操作时室温过低,需适当延长作用时间),用低倍显微镜观察结果。菌落上或紧靠菌落周围的红细胞被美蓝所着色为阳性,指示这种支原体产生过氧化氢。

结 果

一、菌种核实结果

1. 形态学检查: 观察到双丰₂ (“—”后的数字表示本实验室传代次数,以下均同)、168₄、无号₄、武 II₂₂₋₉、武 II₂₇₋₆、武 IV₃₈₋₅、夏 VIII₃、夏 XIII₆、LC₃、成 II₃、Z 固₂、ZS₂ 均显示猪肺炎支原体特有的多形态^[5,7,8](图版 1-1)。孝₃、武 IV₂₀₋₈、L6₃、L13₃、宁₃ 等株的菌体以点球状为主,偶见小环状。

2. 致病性测定: NCTC 10110、Z 固、ZS₂、ZS₃、武 II₂₇₋₁₂、夏 VIII₂₁、LC₂₈ 各株呼吸道接种健康仔猪,诱发了猪地方性肺炎的特征性肺炎病变。L6、L13、宁₃ 腹腔接种健康仔猪,诱发了多发性浆膜炎。同批不接种的对照猪胸、腹腔均无病变。武 IV₃₈₋₃₃、成 II₂₄₋₂₆、65₂₂、武 IV₂₀₋₁₅ 各株不能诱发肺炎。

3. 血清学定型: 经纸片生长抑制试验证实 Z 固、ZS₂、ZS₃、无号、双丰、168、65、武 II₂₂、武 II₂₇、武 IV₃₈、夏 VIII、夏 XIII、LC、成 II 各株与猪肺炎支原体 NCTC 10110、J、201 为同种。L6、L6G₃、L6G₁₃、宁₃、宁₃ 与猪鼻支原体 BTS-7 为同种。

二、溶血试验

17 株猪肺炎支原体,除武 II₂₇ 未行测

定外,其余 16 株恒定地出现溶血活性(表 1, 图版 I-2)。在常规的培养基和大气中,猪肺炎支原体所形成的溶血圈与肺炎支原体 FH 株所形成的相同,为 β 型溶血。丝状支原体丝状变种 C88、腐败毒支原体 S6、KP、猪鼻支原体 L6、L6G₃、L6G₁₃、L₁₃、宁₃、宁,以及生长于牛心汤复合琼脂培养基中

的猪鼻支原体 BTS-7 也均产生 β 型溶血, BTS-7 株生长于含马血清的粘液素-精氨酸琼脂上时,所产生的溶血圈为 α 型。

三、红细胞美蓝着色试验

Z 固 2 次测定时均因菌落过于细小未测出阳性结果。其余 16 株猪肺炎支原体、7 株猪鼻支原体、肺炎支原体 FH、丝状支原体丝状变种 C88、腐败毒支原体 S6 均为阳性,证实这些支原体均产生过氧化氢。猪滑液支原体不产生过氧化氢(表 1, 图版 I-3—8)。

讨 论

1. 经对猪肺炎支原体 16 个菌株进行红细胞美蓝着色试验和血琼脂覆盖试验结果,证明这种 (Species) 支原体产生过氧化氢、具有溶血活性。由于猪鼻支原体同样产生过氧化氢和具有溶血活性,因此用上述试验,无法将猪呼吸道中这二种经常混杂在一起的支原体的菌落加以区别。

2. 过氧化氢是支原体呼吸的最终产物,测定以在菌落含活细胞数最多时进行为好。因而对各种支原体宜先测其生长率,以掌握最适试验时间。在我们实验室中对猪肺炎支原体和猪鼻支原体进行红细胞美蓝着色试验的最适时间分别为 6—12 天和 5—7 天,上述时间同样为测定二种支原体溶血活性的最适时间。延迟试验时间则反应渐弱直至不出反应。Pijoan 未能检出猪肺炎支原体产生过氧化氢^[3],是否与其所取菌落的活性有关。

凡影响支原体活性的因素,均可干扰产生过氧化氢的检出,如在 10℃ 以下室温中操作会使反应缓慢, PBS 的 pH 或美蓝的浓度不当将会导致阴性结果,尤其对于产生过氧化氢不十分强的猪肺炎支原体影响更为明显。

种	株	红细胞美蓝着色	溶血试验
猪肺炎支原体	NCTC 10110	+	+
	J	+	+
	201	+	+
	Z 固	—*	+
	ZS ₂	+	+
	ZS ₃	+	+
	无号	+	+
	双丰	+	+
	168	+	+
	65	+	+
	武 II ₂₂	+	+
	武 II ₂₇	+	未试
	武 IV ₃₄	+	+
	夏 VIII	+	+
	夏 XIII	+	+
	LC	+	+
	成 II	+	+
猪鼻支原体	BTS-7	+	+
	L6	+	+
	L6G ₃	+	+
	L6G ₁₃	+	+
	L ₁₃	+	+
	宁 ₃	+	+
	宁 ₃	+	+
猪滑液支原体	S16	—	—
肺炎支原体	FH	+	+
丝状支原体丝状变种	C88	+	+
腐败毒支原体	S6	+	+
	KP	未试	+

* 菌落细小。

3. 在美蓝着色试验中,肺炎支原体 FH 株,丝状支原体丝状亚种 C88 株,腐败毒支原体 S6 株可作阳性对照株。这三种支原体产生过氧化氢强而持久,用以核对试剂与操作的误差,能起很好的指示作用。FH 株生长缓慢,宜作猪肺炎支原体同批对照,后二株生长迅速,可作猪鼻支原体同批对照。

猪滑液支原体 S16 株是理想的阴性对照株。一批 6 日龄培养物进行试验时,由于猪肺炎支原体 NCTC 10110 菌落细小,红细胞美蓝着色微弱,为进一步观察,将同批标本留置水浴箱中过夜,次日复检时 NCTC 10110 呈强阳性,而 S16 仍然为清晰的阴性。

4. 支原体产生的溶血类型受培养基成份和培养环境的影响。生长于牛心汤复合琼脂培养基上的猪鼻支原体 BTS-7 株产生 β 型溶血,而当其生长于含马血清的粘液素-精氨酸琼脂培养基上时却产生 α 型溶血,与 Aluotto^[9] 所见一致。同样在牛心汤复合琼脂培养基上生长的猪肺炎支原体,在含 5% CO₂ 的潮湿大气中培养时恒定地产生 β 型溶血,而改用氧化锌胶布封皿,在胶布上浸以石蜡的方法,则所产生的溶血为 α 型。

5. 对于人和动物病原性支原体的致病因子,曾经进行过广泛的研究^[10,11]。众多的资料揭示过氧化氢是支原体的致病因子之一^[12-15],我们已经发现猪肺炎支原体产生过氧化氢,由于试验中观察到对猪致病力不强的菌株仍然产生过氧化氢,似乎将它与致病性相联系为时过早。但是,不致病的莱氏非固醇原体产生过氧化氢^[3]、肺炎支原体毒力的丧失并不伴随过氧化氢产生的

减少^[16]的例子,也仅能说明单单产生过氧化氢不足以成为致病因子,并不能否定产生过氧化氢加上别的因素可以构成致病因子。国内外对于猪肺炎支原体从超微结构、生化分析等方面的研究似乎进行不多,进一步的联系、有赖于从微生物细胞学及支原体细胞生化组成等方面找到一些证据。

参 考 文 献

- [1] Lind, K.: *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **78B**: 256—257, 1970.
- [2] Johnson, D. W. and C. C. Muscoplat: *Am. J. Vet. Res.*, **33**: 2593—2595, 1972.
- [3] Pijoan, C.: *Vet. Rec.*, **95**: 216—217, 1974.
- [4] Farrington, D. O. and W. P. Switzer: *Laboratory Diagnosis of Mycoplasmosis in Food Animals*, in *Proc. 19th. Ann. Meet. Am. Asso. Vet. Lab. Diag.*, 1976, p.72.
- [5] 上海农业科学院畜牧兽医研究所猪喘气病研究组: *微生物学报*, **15**(4), 302, 1975.
- [6] Crawford, V. E.: *Manu. Clin. Microbiol.*, **31**: 251—262, 1970.
- [7] L'Euey, C.: *Can. J. Comp. Med.*, **33**: 10—19, 1969.
- [8] Whittlestone, P.: *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, **17**: 1—56, 1973.
- [9] Aluotto, B. B., R. G. Wittler, C. O. Williams and J. E. Faber: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **20**: 35—58, 1970.
- [10] Razin, S.: *Microbiol. Rev.*, **42**: 414—417, 1978.
- [11] Lloyd, L. C., S. H. Buttery and J. R. Hudson: *J. Microbiol.*, **4**: 425—439, 1971.
- [12] Soboslavsky, O. and R. M. Chanock: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **129**: 531—535, 1968.
- [13] Cherry, J. D. and Taylor-Robinson, D.: *Nature, Lond.* **228**: 1099—1010, 1970.
- [14] Somerson, N. L. et al.: *Science*, **150**: 226, 1965.
- [15] Razin, S.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **23**: 317—356, 1969.
- [16] Lipman, R. P. and W. A. Clyde, Jr.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **131**: 1163—1167, 1969.

DETECTION OF HAEMOLYTIC ACTIVITY AND HYDROGEN PEROXIDE FORMATION BY PORCINE RESPIRATORY TRACT MYCOPLASMAS

Zhou Cuidi Chen Jiadi Zhang Huiying Li Jishen

(The Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine,

Shanghai Academy of Agriculture, Shanghai)

Haemolytic activity and hydrogen peroxide produced by porcine respiratory tract mycoplasmas were detected with erythrocyte methylene blue staining Test and blood agar overlay technique. It has been found that the type culture of *M. hyopneumoniae* NCTC No. 10, 110; J;

201 and 13 serologically identified isolates of our country all possess haemolytic activity and are able to produce hydrogen peroxide. A discussion has been made on the technique of assay and the influencing factors involved the pathogenicity of *M. hyopneumoniae*.