

**中华人民共和国农业行业标准**

NY/T 1186—2006

---

**猪支原体肺炎诊断技术**

**Diagnostic techniques for swine mycoplasmal pneumonia**

2006-07-10 发布

2006-10-01 实施

---

**中华人民共和国农业部 发布**

## 前 言

猪支原体肺炎又称猪喘气病,是由猪肺炎支原体引起猪的一种接触性传染病,是造成养猪业经济损失最重要的疾病之一。本病以咳嗽和气喘为主要临床特征,病变部位主要在肺部,可见心叶、中间叶和尖叶有融合性支气管肺炎变化。本病广泛流行于世界各地,欧洲、亚洲、美洲、非洲以及大洋洲等主要养猪国家和地区均有发生。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:农业部动物检疫所、西北农林科技大学。

本标准主要起草人:郑增忍、张衍海、王娟、张彦明。

# 猪支原体肺炎诊断技术

## 1 范围

本标准规定了猪支原体肺炎的病原分离和鉴定及间接血凝试验技术。

本标准适用于猪支原体肺炎的诊断。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 4789.28 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

## 3 临床诊断和病理学检查

### 3.1 临床症状

猪支原体肺炎是一种发病率高死亡率低的慢性呼吸道传染病,主要临床症状为慢性干咳。新发病猪群常呈急性,张口喘气,痉挛性阵咳,死亡率 30% 左右。体温升高不明显。咳嗽持续几周或甚至数月,育肥猪咳嗽最严重。部分患猪呈腹式呼吸,喘息沟明显。食欲减退,消瘦,背毛粗糙,生长停滞,病程主要分急性、慢性两种类型。

### 3.2 病理变化

主要病变见于肺、肺门淋巴结和纵隔淋巴结。急性死亡患猪肺有不同程度的水肿和气肿。肉眼病变类似于膨胀不全的肺,尤其在疾病的慢性阶段。特征性病变是两肺的心叶、尖叶和膈叶前缘发生对称性的实变,肺门淋巴结肿大。肺中间叶实变,以及肺门淋巴结肿大、增生,病变最初为粟粒大至豆大呈均匀的散布,逐渐扩展而融合成支气管肺炎。病变部界限明显,灰白色、无弹性,“胰样”、“鱼肉样”。切开时,内有大量泡沫。其他器官无明显变化。

### 3.3 病理组织学检查

典型病变组织通过用常规的病理切片、染色、脱色后观察,支气管和细支气管上皮组织纤毛数量减少,小支气管周围的肺泡扩大,泡腔充满多量炎性渗出物,肺泡间组织有淋巴样细胞增生。急性病例中,扩张的泡腔内充满浆液性渗出物,杂有单核细胞,中性粒细胞,少量淋巴细胞和脱落的肺泡上皮细胞。慢性病例,其肺泡腔内的炎性渗出物中,主要是淋巴细胞浸润。

### 3.4 X 线检查

X 线检查对本病的诊断有重要价值,对可疑患猪进行 X 线透视,可作出诊断。在 X 线检查时,猪只以直立背胸位为主,侧位或斜位为辅。病猪在肺野的内侧区以及心膈角区呈现絮状及片状阴影,且肺纹理清晰。

## 4 病原分离和鉴定

### 4.1 材料准备

#### 4.1.1 培养基

4.1.1.1 A<sub>26</sub>肉汤:制备方法见附录 A.1。

4.1.1.2 固体培养基:制备方法见附录 A.2。

- 4.1.1.3 厌气肉肝汤:制备方法见附录 A.3。
- 4.1.1.4 血琼脂平板:按 GB 4789.28 的方法配制。

#### 4.1.2 其他材料

- 4.1.2.1 灭菌棉拭子。
- 4.1.2.2 Hank's 液:配制方法见附录 A.4。
- 4.1.2.3 0.25% 鸡红细胞液。

#### 4.2 病料采集

- 4.2.1 活体病料采集:用棉拭子深擦病猪的喉头或鼻腔,采集呼吸道分泌物。
- 4.2.2 死后病料采集:无菌操作采取具有特征性病肺与健肺连接处的肺组织。

#### 4.3 病原分离

将病肺组织剪成  $2\text{ mm}^3$  以下的碎块,浸入 Hank's 液中洗涤,除去血液和组织碎块,取 3 块~5 块浸泡在盛有 5 mL  $A_{26}$  肉汤的试管中;棉拭子浸入约 10 mL  $A_{26}$  肉汤中清洗,并压出棉花中残液,再经  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  的滤膜过滤除菌,将滤液分装于试管。将上述试管置于含 5%~10%  $\text{CO}_2$  环境或用胶塞塞紧管口,在  $37^\circ\text{C}$  进行培养。1 代~3 代分离时须每经 3 d~5 d,以 20% 的接种量连续进行移植;至 4 代~5 代以后,再经 5 d~7 d 连续转移以提高分离率。同时应设厌气肉肝汤、血琼脂平板作为细菌检查的对照。

通过连续继代,当培养物出现有规则的变化时,应涂片镜检;同时将液体培养物作适当稀释后再接种于固体培养基上,在含 5%~10%  $\text{CO}_2$  的环境中  $37^\circ\text{C}$  培养 3 d~10 d。培养时应逐日在低倍镜下观察,若出现圆形、边缘整齐、似露滴状、中央有颗粒、稍隆起的小菌落,判为可疑菌落,需进一步进行鉴定。

#### 4.4 病原鉴定

##### 4.4.1 溶血试验

挑取可疑菌落接种于含猪或鸡红细胞的固体培养基上培养 2 d~3 d,如为猪肺炎支原体,则菌落周围无溶血现象。

##### 4.4.2 精氨酸利用试验

挑取可疑菌落接种于含精氨酸及酚红指示剂的液体培养基中,由于猪肺炎支原体不能分解精氨酸产生氨,故指示剂不变色,试验为阴性。

##### 4.4.3 薄膜和斑点形成试验

挑取可疑菌落接种于含马血清的固体培养基上,由于猪肺炎支原体不能分解其中的脂肪酸,故在固体培养基上菌落的表面和周围不能形成薄膜和斑点。

##### 4.4.4 红细胞吸附试验

将 0.25% 鸡红细胞液滴加于可疑菌落上,静止后弃去红细胞液,用生理盐水冲洗 2 次~3 次,用低倍镜检查,如为猪肺炎支原体可见菌落表面和周围吸附有大量红细胞。

##### 4.4.5 结果判定:以上实验皆为阳性者判为猪肺炎支原体。

#### 5 间接血凝试验

##### 5.1 材料准备

- 5.1.1 96 孔( $12\times 8$ )V 型( $110^\circ$ )有机玻璃反应板、 $25\text{ }\mu\text{L}$  微量移液器、微量振荡器等。
- 5.1.2 猪肺炎支原体纯化灭活抗原、阳性血清、阴性血清。
- 5.1.3 敏化红细胞:为猪肺炎支原体纯化灭活抗原致敏的雄性绵羊红细胞。
- 5.1.4 稀释剂:含 1% 健康兔血清 pH 7.2 PBS。

##### 5.2 操作方法

- 5.2.1 血清的处理:取被检血清 0.2 mL 于无菌小试管中, $56^\circ\text{C}$  水浴 30 min 灭活,冷却后加入 0.3 mL

2%戊二醛红细胞悬液,摇匀,置37℃水浴30 min,离心后吸出血清供检验用。

阳性血清、阴性血清的处理同被检血清。

5.2.2 用微量移液器先向反应板每孔中加入25  $\mu$ L稀释剂,再向第1孔加入25  $\mu$ L已处理好的被检血清,充分混匀后,吸取25  $\mu$ L加入第2孔……,依次做倍比连续稀释至第6孔(血清的稀释倍数为1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:160),混匀后从第6孔取出25  $\mu$ L弃去。

5.2.3 向每孔中加入25  $\mu$ L 2%致敏红细胞,血清的最终稀释倍数为1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320。同时应设阴、阳性血清对照及敏化红细胞空白对照。

5.2.4 置微型振荡器上震荡30 s后,室温静置2 h,观察结果。

### 5.3 结果判定

5.3.1 敏化红细胞对照无自凝现象,阳性对照血清抗体价 $>1:20(+ +)$ ;阴性对照血清抗体价 $<1:5(-)$ 时表明试验成立。

#### 5.3.2 判定标准

- a) + + + + :红细胞100%凝集,在孔底凝集浓缩成团,面积较大;
- b) + + + :红细胞75%凝集,在孔底形成较厚层凝集,面积较大,卷边或呈锯齿状;
- c) + + :红细胞50%凝集,其余不凝集的红细胞在孔底中央集中成较大的圆点;
- d) + :红细胞25%凝集,不完全沉于孔底,周围有散在少量的凝集;
- e) - :红细胞呈点状沉于孔底,周边光滑。

5.3.3 判定:被检血清抗体价 $\geq 1:10(+)$ 者,判为阳性;被检血清抗体价 $<1:5(-)$ 者,判为阴性;介于二者之间者判为可疑。将可疑猪隔离饲养1个月后,再作检验,若仍为可疑反应,按阳性反应判定。

## 附录 A 培养基的制备

### A.1 A<sub>26</sub>肉汤

#### A.1.1 成分

1%水解乳蛋白 Hank's 液	500 mL
牛心消化汤	250 mL
犊牛血清	200 mL
50%葡萄糖	20 mL
酵母浸出液	10 mL
青霉素	20 万 IU
1%醋酸铊	2.5 mL
1%酚红	2 mL
1%辅酶 I	10 mL

#### A.1.2 制法

以上各成分除青霉素外,其余各成分均应 106 kPa 高压灭菌 15 min 后冷冻或冷藏保存备用。使用时将以上各成分按比例混匀后,将 pH 调至 7.6。

牛心消化汤按 GB 4789.28 中 4.3 规定配制。

### A.2 固体培养基

将 1%水解乳蛋白 Hank's 液与牛心消化汤按 A.1 中的比例混合,将 pH 调至 7.6 后,加入 1%的琼脂,溶解后 106 kPa 高压灭菌 15 min,冷却至 56℃左右,加入 A.1.1 中的其他成分,倾注平皿。

### A.3 厌气肉肝汤

#### A.3.1 成分

牛肉	1 份
牛(羊、猪)肝	1 份
蒸馏水	4 份
蛋白胨	1%
氯化钠	0.5%
葡萄糖	0.2%
小肝块	10%
石蜡	适量

#### A.3.2 制法

A.3.2.1 取除去脂肪及筋膜的牛肉,用绞肉机绞碎,与切成 100 g 左右的肝块各 1 份,加蒸馏水 4 份,充分搅拌后,冷浸 20 h~24 h。

A.3.2.2 煮沸 30 min~60 min,补足失去的水分,用白棉布过滤,弃去肉渣,取出肝块。

A.3.2.3 滤液加入 1%蛋白胨和 0.5%氯化钠,加热溶化,以 2 mol/L 氢氧化钠(NaOH)溶液调整 pH 为 7.8~8.0,加热煮沸。

- A.3.2.4 以白棉布过滤,按量加入0.2%葡萄糖,搅拌使其溶化。
- A.3.2.5 将煮过的肝块洗净,切成小方块,用蒸馏水充分冲洗后,分装于试管中,其量约为预计分装肉肝汤量的1/10。
- A.3.2.6 将滤液分装于含有肝块的试管中并加入适量石蜡,以68.94 kPa高压灭菌30 min~40 min。
- A.3.2.7 经37℃培养24 h~48 h应无菌生长。

#### A.4 Hank's 液的制备

##### A.4.1 甲液

氯化钠(NaCl)	160 g
氯化钾(KCl)	8 g
硫酸镁(MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	2 g
氯化镁(MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	2 g
加蒸馏水	至 800 mL
氯化钙(CaCl <sub>2</sub> )	2.8 g
加蒸馏水	至 100 mL

将上述两种溶液混合后,加蒸馏水至1 000 mL,并加2 mL 氯仿作为防腐剂,保存于4℃冰箱内。

##### A.4.2 乙液

磷酸氢二钠(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O)	3.04 g
磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.2 g
葡萄糖	20 g

将上述成分溶于800 mL蒸馏水中,再加入100 mL 0.4%酚红液。加蒸馏水至1 000 mL,并加2 mL 氯仿防腐,保存于4℃冰箱内。

##### A.4.3 制法

按下述比例配制:

甲液	1 份
乙液	1 份
蒸馏水	18 份

106 kPa 灭菌15 min后,置4℃冰箱内备用。使用时于100 mL Hank's 液内加入3.5%碳酸氢钠(NaHCO<sub>3</sub>)液,将pH调至7.2~7.6。