

# 在显微镜下观察微粒凝集 反应对猪地方性肺炎的诊断和鉴定 猪肺炎支原体的研究

何正礼、储静华、金洪效、毛洪先、叶爱红、陈志森、张瑞义、张大隆

(江苏省农业科学院畜牧兽医研究所)

## 提 要

显微镜下观察猪肺炎支原体纯培养物与56°C灭活30分钟的待检血清混合，经在37°C培养24—48小时，涂片，以瑞氏染色后镜检。试验的方法有二：〈1〉无菌小试管中装0.4毫升纯培养旺盛的猪肺炎支原体，加0.1毫升灭活待检血清，加橡皮塞，混合培养。〈2〉适宜猪肺炎支原体生长的液体培养基0.36毫升，种入生长旺盛的、纯粹的猪肺炎支原体新鲜培养物0.04毫升，加灭活待检血清0.1毫升，加橡皮塞，混合培养。第〈1〉法凝集较快些，但凝集粒内菌体清晰度不如第〈2〉法。第〈2〉法凝集慢些，但菌体多系新增殖的，故在凝集粒内较为清晰。人工感染54只猪，在经X射线透视发现病变阴影后8天，可出现血清凝集阳性。一个月后达到高峰，并维持六周左右，其后逐渐下降，直至五个月，纵然病变完全消失（X射线透视阴性），仍有可见的阳性凝集反应。经采集野外感染猪群的猪血清共116份，X射线透视阳性者100份，作微粒凝集反应出现阳性者82份，符合率为82%。X射线透视阴性者16份，微粒凝集反应阴性者12份，符合率为75%。所以有此出入，盖因血清中凝集素的出现较X射线透视出现病变阴影为慢，又当病变消失，X射线透视转为阴性时，尚有一段时间凝集反应仍为阳性之故。

同法，以安宁\*168株猪肺炎支原体的抗血清分别与已知的猪鼻支原体、猪滑液支原体、莱氏衣原体混合培养，涂片检查均为阴性，而检查的国内猪肺炎支原体培养、和美国寄来的“J”株猪肺炎支原体培养、涂片检查，凝集反应均为阳性。

由上结果，可以使用此法于诊断。除可在无X光线处应用外，并可补X光机诊断之不足，而且纵然X射线透视为阴性，如若有的猪微粒凝集试验为阳性，可以推断此猪群曾被感染，尚有些猪可能带有猪肺炎支原体。也可用此法鉴定猪支原体种属。

## 前 言

目前国内外曾使用补体结合试验(1、2、3、4、5、22)、微量补体结合试验(6)、间接免疫荧光抗体试验(14、15、19、22)、凝胶扩散试验(12)、结合的免疫酶吸附试验(16)、明胶电泳试验(17、20)、生长沉淀试验(18)和凝集试验等血清学方法用于检出病猪血清中猪肺炎支原体的抗体,其中以凝集反应在血清学诊断工作中是应用广泛而又简便的一种方法。它对于猪地方性肺炎的诊断和鉴定支原体菌种,曾有一些研究者加以尝试,如:试管凝集试验(13、23)(Lannek和Wesslen氏1955;Fujikura氏等1970;Pijoon和Boughton氏1974);间接血球凝集试验(7、8、9)(Goodwin氏等1969;Lam和Switzer氏1971,Holmgren氏1974)和胶粒凝集试验(10、11)(Balke, E.和Slavik, M.F.氏等1976)。但由于猪肺炎支原体生长要求苛刻,制备抗原相当麻烦,肉眼不易看出凝集颗粒,难以分辨得出病猪和健猪。我们(1975)也曾做过试管凝集试验,仅能见到高免兔血清能出现低度的凝集反应,而对病猪血清未能见到与健康猪血清有所区别,因而中止试验。

近来,我们试用病愈猪血清和酸化处理后的病猪血清替代健猪血清用于培养基,经过一定的生长时间,涂片染色置于显微镜油镜下检查,经常发现猪肺炎支原体菌体凝集现象,于是进行了比较系统的研究。现将初步研究的经过情况及其结果,叙述如后:

### 一、研究的方法和材料

#### 1. 抗原的培养和制备

选用对健康猪具有致病性的,特异多形态的猪地方性肺炎支原体安宁系\*168菌株,该菌株曾经三次在固体培养基上生长,挑选单菌落纯化后冻干保存。取菌种接种于改进的Switzer氏培养基(KM<sub>2</sub>),37℃培养48—72小时,待pH7.6降至7.0—6.8;并有均匀一致的轻微混浊的培养物,经涂片、染色、镜检可见大量的、多形态的菌体。用上述培养物作为一级种子,进行二级繁殖,均按1:9接种量,每批次扩大培养物至800—1000毫升,作离心沉淀浓缩抗原之用。猪肺炎支原体的培养物用瑞典生产的Wifug牌R型离心机,以每分钟8000—9000转速离心沉淀30分钟,倾去上清液,留沉淀物用0.9%灭菌生理盐水反复冲洗离心管壁,吸取沉淀物,使成混悬液,如此反复离心沉淀、洗涤三次,最后的沉淀物作百倍浓缩,制备成浓缩抗原与弗氏完全佐剂混成乳剂或与生理盐水制成百倍浓缩悬浮液,作为高度免疫兔和猪的抗原注射物,行肌肉或耳静脉注射免疫。

#### 2. 高免血清的制备:

用百倍浓缩的洗涤活抗原,以1比1加弗氏完全佐剂制成乳剂,肌注于健康兔和健康猪各3头,每头2毫升,以后每隔7—10天注射一次,共三次作为基础免疫;后三次用百倍浓缩的洗涤活抗原,每次间隔2周静脉注射1—3毫升。免疫家兔于最后一次免疫注射后第16天心脏采血,按常规方法制备血清,获得家兔高免抗血清,贮藏-15℃冻结保存。

免疫的3头猪于最后一次免疫注射后第12天,出现腹式呼吸气喘症状并拒食,经X射线透视确诊为猪地方性肺炎,随即使用卡那霉素和土霉素进行交替治疗,治愈后14

天,再用1:4冻干强毒滴鼻5毫升,攻毒后21天,颈总动脉放血致死。按常规方法制备血清,冻结保存备用。

### 3. 微粒凝集反应的操作方法:

试验方法有二:〈1〉无菌小试管中装0.4毫升新鲜培养旺盛的猪肺炎支原体,加0.1毫升56℃灭活30分钟待检血清,混合;〈2〉适宜于猪肺炎支原体生长的液体培养基0.36毫升,种入生长旺盛的、纯粹的猪肺炎支原体新鲜培养物0.04毫升,加灭活待检猪血清0.1毫升混合,加灭菌橡皮塞。经在37℃中培养24—48小时后涂片,以瑞氏染色后,置1500×显微镜下观察。第(1)法凝集较快些,但凝集粒内的菌体清晰度不如第(2)法。第(2)法凝集慢些,但菌体多系新增殖的,故在凝集粒内较为清晰。是否含有清晰的猪肺炎支原体菌体凝集团粒存在,作为判定病猪、曾感染过的猪和健康猪的区别,以及鉴定猪肺炎支原体菌株种的根据。

猪支原体菌株种的鉴定方法:依上述同样方法,将待检的猪支原体培养物与已知的猪肺炎支原体(\*168菌株)免疫猪血清或兔抗体血清作微粒凝集反应试验,以鉴定猪支原体菌株是否为猪肺炎支原体。

#### 微粒凝集反应的判定标准:

加入已知的抗原(猪肺炎支原体培养物)与待检血清,或已知的抗体血清与待检的培养物(抗原),混合培养,制成涂片,在显微镜下观察,如支原体菌体均匀一致地分布,定为无凝集反应(-);呈现小部分菌体凝集反应为(+);大部分菌体凝集反应(++);全部菌体凝集反应(+++).详见本文所附照片。

## 二、试验结果

### (一)测定加入不同量的病猪血清与凝集反应:

为了测定抗原与抗体血清最合适的比例,分别以30%、20%、10%、4%和2%的待检抗体血清与已知的抗原作凝集反应。从表一结果可见:抗体血清加入量的比例,由10—30%均可在显微镜下见到微粒凝集反应,但以20%的抗体血清比例为最佳。

### (二)测定微粒凝集试验,于37℃培养不同时间,出现的凝集反应:

为了测定微粒凝集反应在37℃培养条件下,出现凝集的时间,分别于凝集试验后置于37℃培养2、4、6、9、24小时制作涂片,染色镜检观察,结果:最早可于4小时后开始出现凝集,而以24小时后凝集较为显著,详见表二。

### (三)猪地方性肺炎的病程经过与微粒凝集反应:

经微粒凝集反应试验观察结果:未经猪地方性肺炎感染过的健康猪血清均为阴性;病程在30天以上的病猪血清均为阳性;病愈猪血清均为强阳性反应。详见表三。

### (四)测定微粒凝集反应与X射线透视符合率的比较试验:

1.人工感染试验:目前国内普遍使用X线机胸部透视检查作为诊断本病的有效工具。但由于物质条件限制和体型过大的种猪难以透视,在生产上大面积普遍推广应用难以实现。故测定微粒凝集反应与X线透视符合率的比较试验,以便应用于生产实际,作为综合防治猪地方性肺炎另一种诊断方法。

具体操作:用安宁系冻干强毒1:25稀释每头滴鼻5毫升,人工接种感染杂交猪5

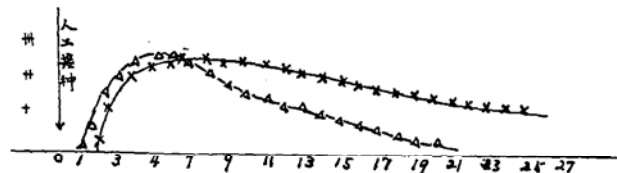
表一、测定加入不同量的病猪血清与微粒凝集反应

抗原编号	抗体血清	抗体血清比例(%)				
		30%	20%	10%	4%	2%
Ⅱ S <sub>1</sub> d <sub>10</sub> WF <sub>1</sub>	*25病猪血清	-	++	++	++	-
168F96-11	*25病猪血清	ND	+++	++	+	-
168F96-11	*28病猪血清	ND	+	++	+	-
168F96-11	*11病猪血清	ND	+++	++	+	-
168F96-11	*77病猪血清	-	+++	++	+	-
168F92-9	*40病猪血清	-	++	-	-	-
168F92-9	*43病愈猪血清	++	++	+	-	-
168F92-9	*14病猪血清	+	+	-	-	-
168F97-11	*119病愈猪血清	+	++	-	-	-
168F97-11	*75攻毒对照猪	++	++	+	ND	ND
168F97-11	*79强毒猪血清	+	+	+	ND	ND
168F97-11	*78病猪血清	+	+	+	ND	ND
168F97-11	*63病猪血清	++	+++	++	ND	ND
168F97-11	*41病猪血清	+	++	+	ND	ND
168F97-11	*43病猪血清	+	++	+	ND	ND
168F97-11	*44病猪血清	+	++	++	ND	ND
168F97-11	*45病猪血清	+	+	+	ND	ND
168F97-11	*47病猪血清	++	+++	+	ND	ND
168F97-11	*50病猪血清	++	+++	+	ND	ND
168F97-11	*75病猪血清	++	++	+	ND	ND
168F97-11	*79病猪血清	++	++	+	ND	ND
168F97-11	健康猪血清	-	-	-	ND	ND

符号说明: ND: 未做, -: 无凝集反应, +: 轻度凝集, ++: 中度凝集, +++: 完全凝集。

头, 焦溪土种猪 5 头, 共 10 头猪。接种前全部经 X 射线透视为阴性, 无菌手续采血提取血清。人工接种感染后 X 线透视出现阴影时, 以无菌手续采血, 提取血清。以后每周采血检查一次, 所有血清均经 56℃ 半小时灭能。将上述血清代替健猪血清, 以 20% 加入江苏二号(KM<sub>2</sub>)培养基中, 用 168F112 菌株 48 小时培养物, 以 10% 剂量种入, 放于 37℃ 培养 48 小时后抹片用瑞氏染色镜检, 结果见下图:

微粒凝集反应和 X 射线透视情况示意图



注: ①△—△代表X射线透视病变; X---X代表微粒凝集反应。

②纵坐标上符号是表示微粒凝集反应(+表示小部分凝集; ++表示大部分凝集; +++表示全部凝集)及X射线透视所见病猪肺部病变情况。

③横坐标上数字代表时间(周)。

表二、微粒凝集试验于37℃培养不同时间出现的凝集反应

抗原编号	抗体血清	制作涂片时间镜检结果				
		2小时	4小时	6小时	9小时	24小时
11 S <sub>1</sub> d <sub>10</sub> WF <sub>3</sub>	*25病猪血清	-	-	+	+	++
168F95-6	*25病猪血清	-	+	-*	++	+++
168F95-6	*28病猪血清	-	+	-*	++	++
168F96-11	*11病猪血清	-	-	+	-*	+++
168F96-11	*77病猪血清	+	++	++	++	+++
168F92-9	*40病猪血清	+	+	++	-*	-*
168F92-9	*43病猪血清	+	+	+	-*	++
168F92-9	*14病猪血清	-	-	-	+	+
168F97-11	*119病愈猪血清	-	+	-*	++	++
168F97-11	*75攻毒对照猪	-	+	+	++	++
168F97-11	*79强毒猪血清	-	+	+	++	++
168F97-11	*78病猪血清	-	-	+	+	++
168F97-11	*63病猪血清	-	+	+	+	+++
168F97-11	*41病猪血清	-	+	+	+	++
168F97-11	*43病猪血清	-	+	+	+	++
168F97-11	*44病猪血清	-	+	+	+	++
168F97-11	*45病猪血清	-	+	+	+	++
168F97-11	*47病猪血清	-	+	+	++	+++
168F97-11	*50病猪血清	-	+	+	+	+++
168F97-11	*75病猪血清	-	+	+	+	++
168F97-11	*79病猪血清	-	+	+	+	++

\*: 系指涂片固定不良而脱落, 未得结果。

由上图来看, 当X射线透视看到发病一周多, 病猪血清中即出现凝集素抗体, 病程至第六周病变达高峰, 而病猪体中血清抗体也到达高峰, 病变从第六周后逐渐趋向康复, 但病猪血清中凝集抗体从第六周起维持在高峰至第十一周后逐渐下降。所以说, X射线透视与血清学微粒凝集反应基本相符, 符合率为80%左右。

另用安宁系、孝陵卫系菌株人工感染土种焦溪猪发病后, 于不同时期进行X射线透视后, 无菌手续采血, 提取血清, 56℃半小时灭能, 用168菌株的纯培养物作微粒凝集反应, 共54头猪。其中除“0”号猪发病8天后采取的血清所作的微粒凝集反应为阴性外, 其余人工感染的病猪血清, 均出现微粒凝集反应与X射线透视所见病变基本相符合。结果详见表四。

2. 野外试验: 在南京市郊区三个有气喘病的养猪场, 采集自然发病猪血清和X线透视阴性猪血清作比较试验, 共计116头待检血清样品。其中X射线透视为阳性者100头, 作微粒凝集出现阳性者82头, 符合率为82%; X射线透视为阴性者16头, 微粒凝集反应阴性者12头, 符合率为75%。由此可知: 微粒凝集反应与X射线透视基本相符, 可以作为生产现场的一种诊断手段。不尽符合的原因, 可能与微粒凝集的出现较之X射线透视

表三、猪地方性肺炎的病程与微粒凝集反应的关系

抗体血清来源	病程经过(天数)	微粒凝集反应	
		第一种方法	第二种方法
25*病愈猪血清	病程57天, 恢复后14天剖杀	+++	ND
28*病愈猪血清	病程57天, 恢复后14天剖杀	+++	ND
11*病愈猪血清	病程51天, 恢复后21天剖杀	+++	ND
77*病猪血清	攻毒对照病程23天剖杀采血	++	ND
40*病猪血清	病程46天, 土霉素治愈病猪	++	+
43*病愈猪血清	人工感染病猪, 病程36天	+++	+++
14*病猪血清	免疫猪攻毒, 病程56天	++	ND
119*病愈猪血清	人工感染病猪, 病程30天	+++	+++
75*攻毒对照猪	攻毒对照病程50天, 病愈后9天	++	+++
79*强毒猪血清	鲜毒攻毒对照猪, 病程70天	+++	+++
78*病猪血清	鲜毒攻毒对照猪, 病程70天	++	+++
63*病猪血清	人工发病猪, 病程34天	+++	+++
41*病猪血清	病程71天, 病愈恢复	+++	+++
43*病愈猪血清	病程56天, 病愈恢复	+++	+++
44*病猪血清	病程63天	+++	+++
45*病猪血清	病程71天, 病愈恢复猪	+++	+++
47*病猪血清	病程71天病猪血清	+++	+++
50*病猪血清	病程57天病猪血清	+++	+++
75*病猪血清	病程57天病猪血清	+++	+++
81*病猪血清	人工感染病程9天	-	+
正常猪血清对照	78年9月20日制备正常猪血清	-	-
无号健康猪血清	健康杂交猪血清	-	-
3*健康猪血清	健康杂交猪血清	-	-
6*健康猪血清	健康杂交猪血清	-	-
9*健康猪血清	健康杂交猪血清	-	-
107*健康猪血清	健康杂交猪血清	-	-
二花脸健猪血清	太湖土种猪血清	-	-
二花脸健猪血清	太湖土种猪血清	-	-

ND: 未做。

所见阳性为晚, 而在X射线透视病变阴影消失之后, 仍然存在相当长的一段时间之故。

(五)以安宁系\*168抗体血清与不同菌株作微粒凝集反应鉴定不同品系的猪肺炎支原体和不同种支原体的试验:

我们用\*168抗体猪血清与不同菌株的37℃48—72小时培养物作微粒凝集试验, 制作涂片、染色、显微镜观察菌体凝集与否。其结果: 凡是具有特异的典型多形态构造的菌体, 都能与\*168抗体血清发生微粒凝集反应, 并可对健康猪有致病力, 使健猪肺部引起特征性的猪地方性肺炎的病灶。详见表五。

表四、人工感染病猪出现微粒凝集反应与X射线透视所见阴影的相关性

血清编号	病程天数	X射线 透视检 查病变	微粒凝 集反应	血清编号	病程天数	X射线 透视检 查病变	微粒凝 集反应
*3病猪血清	8天	++	++	孝5病猪血清	42天	+	++
*6病猪血清	8天	+	++	*938病猪血清	42天	+	++
*9病猪血清	8天	++	++	*939病猪血清	42天	+	+++
*安10病猪血清	8天	+	+++	*940病猪血清	49天	+	+++
*107病猪血清	8天	+	++	*937病猪血清	49天	±	+++
*82病猪血清	8天	±	+	*40病猪血清	46天后土霉素治愈	-	++
*0病猪血清	8天	+	-	*14病猪血清	56天	++	++
*839病猪血清	10天	++	+	*930病猪血清	56天	+	+++
*89病猪血清	13天	++	++	*50病猪血清	57天	++	+++
*90病猪血清	13天	++	++	*926病猪血清	56天	±	+++
*91病猪血清	16天	++	++	*927病猪血清	56天	±	+++
*92病猪血清	16天	++	++	*75病猪血清	59天后自愈	-	++
*836病猪血清	14天	++	++	*42病猪血清	63天后自愈	-	+++
*86病猪血清	14天	±	+	*44病猪血清	63天	++	+++
*31病猪血清	21天	+++	+++	*929病猪血清	63天	±	+++
*32病猪血清	28天	+++	+++	*928病猪血清	70天	±	+++
*33病猪血清	21天	+++	+++	*78病猪血清	70天	±	+++
*34病猪血清	21天	+++	+++	*79病猪血清	70天	+	+++
*35病猪血清	21天	+++	++	*41病猪血清	71天后自愈	-	+++
孝I病猪血清	21天	++	+++	*45病猪血清	71天后自愈	-	+++
*77病猪血清	23天	++	++	*47病猪血清	71天	+	+++
*119病猪血清	30天后自愈	-	+++	*11病猪血清	51天自愈72天	-	+++
*63病猪血清	34天	++	+++	*25病猪血清	57天自愈71天	-	+++
*43病猪血清	36天	-	+++	*28病猪血清	57天自愈71天	-	+++
*936病猪血清	35天	±	++	*杂交猪病猪血清	100天自愈	-	+++
*111病猪血清	35天	+	+++	2*正常猪对照血清	健康猪血清	-	-
*4病猪血清	35天	±	+	4*正常猪对照血清	健康猪血清	-	-
*21病猪血清	35天	++	+++	5*正常猪对照血清	健康猪血清	-	-
				7*正常猪对照血清	健康猪血清	-	-

表五、以安宁系\*168抗体血清与不同菌株作微粒凝集反应鉴定不同品系的猪肺炎支原体和不同种支原体的试验

提供菌种单位	菌株名称	菌体形态	对健康猪致病性	微粒凝集反应	
				第一种方法	第二种方法
江苏省农科院牧医所	*168	标准型多形态	+	++	++
江苏省农科院牧医所	双丰	标准型多形态	+	++	++
江苏省农科院牧医所	无号	标准型多形态	- ※①	++	ND
江苏省农科院牧医所	孝陵卫	标准型多形态	+	+	++
上海市农科院牧医所	济南	标准型多形态	+	++	++
西北农学院牧医系	长安7802E	标准型多形态	+	+	ND
宁夏农科所兽医系	105	标准型多形态	+	+	++
黑龙江省兽医所	78-5-33	标准型多形态	+	※②	+
湖南省兽疫防疫站	湘西直	标准型多形态	+	ND	++
湖北省牧特产所兽医系	武Ⅱ	标准型多形态	+	+	++
黑龙江省兽医所	77-9-L <sub>1</sub>	标准型多形态	+	++	ND
黑龙江省兽医所	病肺强毒分离	标准型多形态	+	++	ND
四川省农科院牧医所	千成Ⅱ	标准型多形态	+	++	ND
四川省农科院牧医所	广11	标准型多形态	+	++	ND
四川省农科院牧医所	广1P82	标准型多形态	+	+++	ND
宁夏农科所兽医系	Ⅶ株	标准型多形态	+	+	ND
美国爱荷华州立大学兽医研究所	猪肺炎支原体J株 ※③	标准型多形态	-	++	++
美国爱荷华州立大学兽医研究所	猪鼻支原体	颗粒, 偶见小环状	试验中	-	-
美国爱荷华州立大学兽医研究所	猪滑液支原体	圆形颗粒	试验中	-	-
美国爱荷华州立大学兽医研究所	莱氏衣原体	圆形颗粒	试验中	-	-
广西兽医研究所	广西LP295	小环状	-	-	-
上海市农科院牧医所	龙华L13	圆点状, 偶见小环状, 边缘不整齐	-	-	-
宁夏农科所兽医系	宁所XⅡ	小圆状, 边缘不整齐	-	-	ND
宁夏农学院牧医系	宁3A肺	颗粒状, 生长迅速	多浆膜性炎症	-	-

备注: ①标准型多形态指菌体呈两极、环状、灯泡、车轮等多形态。②(+)代表有致病性, (-)代表无致病力, ③ND: 未做。※①(-)仅初代次, 10代之内有致病力。※②毒力较弱。※③滴鼻接种, 1/4猪于接种后67天透视±

显微镜观察下的微粒凝集反应简单易行, 除可用于诊断和鉴定支原体菌种之外, 由于用它检查出, 曾经感染过支原体肺炎, 而无症状并经X光透视也无可见病变阴影的猪, 长期呈现阳性反应, 而且有部份猪可能带肺炎支原体, 故可用之于检疫和清除带菌种猪以建立无支原体肺炎的健康猪场。这项试验在进行中, 待经实践著有成效之后, 当另总结。



## 参 考 文 献

1. Boulanger, P. and L'Ecuyer, C.(1968). Enzootic Pneumonia of Pigs, Complement-fixation tests for the detection of Mycoplasma antibodies in the serum of immunized rabbits and infected swine. *Canad. J. Comp. Med.*, **32**: 547-554.
  2. Hodges, R.T. and Betts, A.O.(1969). Complement-fixation test in the diagnosis of Enzootic Pneumonia of Pigs. I. Experimental Studies. *Vet. Rec.*, **85**: 454-455.
  3. Hodges, R.T., and Betts, A.O.(1969). Complement-fixation test in the diagnosis of Enzootic Pneumonia of Pigs. II. Field Studies. *Vet. Rec.*, **85**: 455-458.
  4. Blackburn, B.O. et al.(1975). Detection of Mycoplasma hyopneumoniae antibodies in porcine serum by complement-fixation test. *Am. J. Vet. Res.* **36**(9): 1381-1382.
  5. Switzer, W.P., and Kenneth, S.P.(1974). Application of the complement-fixation test to the control of Mycoplasmal pneumonia in swine. *J. A. V. M. A.* **165**: (8). October 15, p.725.
  6. Slavik, M.F. and Switzer, W.P.(1972). Development of a microtitration complement-fixation test for diagnosis of Mycoplasmal swine pneumonia. *Ia State. J. Res.* **47**: 117-128.
  7. Holmgren, N.(1973). An indirect hemagglutination test for detection of antibodies against *Mycoplasma Hyopneumoniae* using formalized tanned swine erythrocytes. *Acta. Vet. Scand.*, **14**: 353-355.
  8. Holmgren, N.(1974). Swine Enzootic Pneumonia; Immunologic studies in infected sow herds. *Res. Vet. Sci.* **17**(2): 145-153.
  9. Lam, K.M. and Switzer, W.P.(1973). Mycoplasma pneumonia of swine. Development of an indirect hemagglutination test. *Amer. J. Vet. Res.* **32**: 1731-1736.
  10. Balke, E., Schliesser, T., Heun, E.(1976). Differentiation of porcine mycoplasmas by latex agglutination. *Erste Abteilung Originale 234A* (2) 260-264.
  11. Slavik, M.F.(1976). Adaptation of latex agglutination tube test for diagnosis of Mycoplasma hyopneumonia swine pneumonia. *Dissertation Abstraction International* 77b(6) 2703-2707.
  12. Ball, J.H., and Todd, D.(1978). Comparison of antigens of pneumonia-associated mycoplasma species by gel diffusion. *Infection and Immunity*, **2**(3): 954-958.
-

13. Pijoan, C., Boughton, E.(1974). Tube agglutination tests with *Mycoplasma hyopneumonia* and *Mycoplasma hyorhinis*. Brit. Vet. J. **130**(6); 593-598.
14. Stone, S.S., Tessler, J.(1974). Fluorescent labeling of antibody for identifying mycoplasma colonies by incident ultraviolet light. Amer. J. Vet. Res., **35**(1); 107-110.
15. Perfumo, C.J.(1976). Isolation of mycoplasma from the lungs of pig with enzootic pneumonia, and typing these strains by epi-immunofluorescence. Revista de Medicina Veterinaria Argentina, **57**(2): 77-82.
16. Bruggmann, S.T., Keller, H., Bertschinger, H.U., Engberg, B. (1977). Quantitative detection of antibodies to *Mycoplasma Sui pneumoniae* in pigs sera by an enzyme-linked immunosorbent assay. Vet. **101**; 109-111.
17. Balke, E.(1975). Differentiation of pig mycoplasmas by acrylamide gel electrophoresis. Erste Abteilung Originale, **230A**, Heft 3; 398-405.
18. Gois, M., Kuksa, F.,(1975). Diagnosis and differentiation of porcine mycoplasmas by the growth-precipitation test. Zentralblatt für Veterinarmedizin, **22B**(10); 850-855.
19. Bruggmann, S.T., Keller, H., Bertschinger, H.U., Engberg, B. (1976). A new method for the demonstration of antibodies against *Mycoplasma sui pneumoniae* in pigs' sera. Vet. Rec. **99**; 101.
20. Goldschmidt, B.L., Menonna, J, P., Dowling, P.C., Cook, S.D. (1976). Rapid detection of mycoplasma antibody. Journal of Immunology, **117**(3): 1054-1055.
21. Keusters-klasens, M., et al.(1974). Use of a rapid serum plate test (RSPT) antigen for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* antibodies in pig serum. In Proceedings of third International Pig Veterinary Society Congress, Lyon, France. Section R5, 1-6.
22. 越智勇一、尾形学著: (1973)《猪流行性肺炎》。北京市农业科学院情报资料室译。
23. 藤仓氏等: (1971)日本《农林省家畜卫生试验场研究报告》。No. **62**: 102-107

## MICROAGGLUTINATION TEST FOR THE DIAGNOSIS OF SWINE MYCOPLASMAL PNEUMONIA AND THE IDENTIFICATION OF MYCOPLASMAS

Ho Cheng-lee, Chu Tsinghua, Chin Hunghsiao, Mao Hungsien,  
Yeh Aihung, Chen Chihshen, Chang Shuii, Chang Dalung.

*(Research Group of Swine Mycoplasmal Pneumonia, Institute of Animal  
Husbandry and Veterinary Medicine, Kiangsu Academy of Agricultural  
Science, Nanking, People's Republic of China)*

### Summary

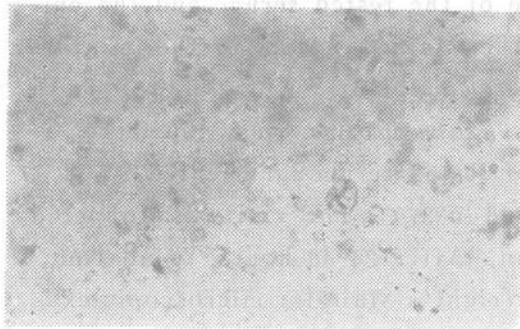
In order to save time in preparing the poorly yielded antigen from the fastidious growth culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*, we directly used the pure culture as an antigen instead. To overcome the slow re-activeness of the mycoplasma-infected pig's sera in the ordinary agglutination test, we incubated the mixture of the tested serum and the culture for 24-48 hours, and examined the stained smears of the mixture under microscope. Two procedures were adopted: (1) 0.4 ml of fresh pure luxuriant culture of *Mycoplasma hyopneumoniae* was added to a small sterile vial containing 0.1 ml of tested serum inactivated by 56°C for 30 minutes, mixed well, and incubated in 37°C. The vial was stoppered with rubber cap to prevent evaporation. After 24-48 hours' incubation, smears were made and stained with Wright's stain for microscopic examination. (2) 0.36 ml of modified Switzer's medium (KM<sup>2</sup>), 0.04 ml of fresh pure luxuriant culture and 0.1 ml of tested serum were mixed well in a sterile small vial, and incubated in 37°C for 24-48 hours. Made smears and examined as in (1). The positive reactions appeared earlier in (1) than in (2), while the mycoplasmal cells in the agglutinated clumps were clearer in (2) than in (1). All the serum samples from 54 experimentally infected pigs showed positive reactions in the microagglutination test. A great majority of the positive reactions appeared 8 days after the occurrences of the shadows of lung lesions detected by X-ray. A month later the intensities of reactions reached a peak, maintained for about 6 weeks, and declined thereafter. 5 months later positive reactions were still detectable, even when the lung lesions were no longer detectable by X-ray examination,

Out of 100 serum samples collected from pigs with lung lesions detected by X-ray in field infected herds, 82 (82%) showed positive reactions in the microagglutination test, and out of 16 serum samples collected from pigs without lung lesions by X-ray detection 12 (75%) were negative in the microagglutination test. Antisera against the Annin (a county name in Gansu province) strain of *M. hyopneumoniae* showed positive reactions with 20 strains of Mycoplasmas collected from laboratories in different provinces of China, but did not react with *M. hyorhinis*, *M. synoviae* and *Acholeplasma laidlawii*. The J strain of *M. hyopneumoniae* from U. S. A. also reacted positively with hyperimmune anti-serum against the Annin strain of *M. hyopneumoniae*.

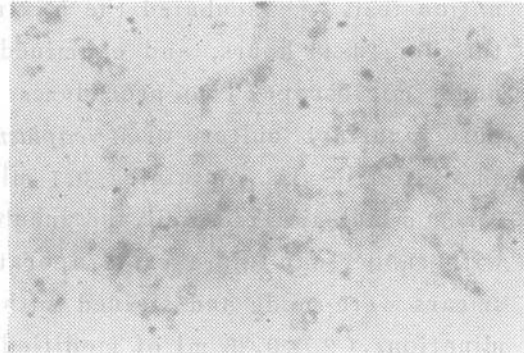
#### Acknowledgment

We are deeply grateful to Dr. R. F. Ross of Iowa State University, U. S. A., who kindly sent us cultures of *M. hyorhinis*, *M. synoviae*, *A. laidlawii* and J strain of *M. hyopneumoniae*.

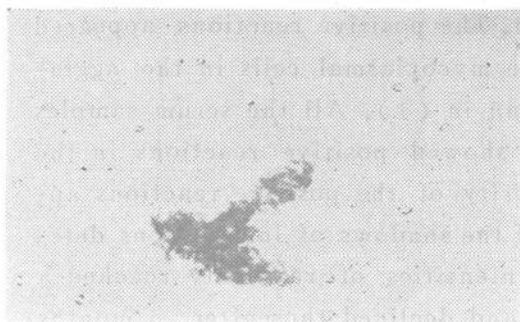
在显微镜下观察微粒凝集反应对猪地方性肺炎的诊断和鉴定猪肺炎支原体的研究



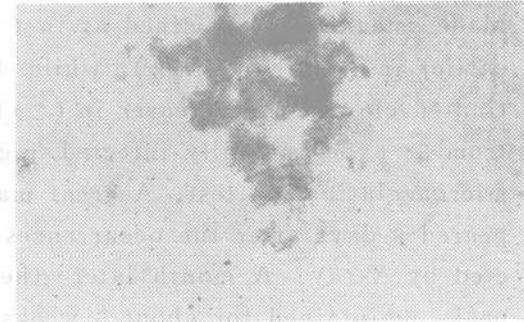
图一：猪地方性肺炎的病原菌—猪肺炎支原体生长在KM<sub>2</sub>培养基中37°C72小时的培养物



图二：次猪肺炎支原体培养物为抗原与病猪血清呈现轻度微粒凝集反应(+)



图三：次猪肺炎支原体培养物为抗原，与病猪血清呈现中度微粒凝集反应(++)



图四：次猪肺炎支原体培养物为抗原与病猪血清呈现重度微粒凝集反应(+++)