

我国猪呼吸道支原体血清学定型研究

周翠堤 陈嘉棣 黎济申

(上海市农业科学院畜牧兽医研究所)

(1980年11月17日收稿)

摘 要

运用干燥圆纸片生长抑制试验,以猪喘气病病原支原体济南株及疑似猪鼻支原体L6株的抗血清,将我国六省(市、自治区)从猪呼吸道分离的21株支原体,从血清学上鉴定为二个种。其中12株猪喘气病病原支原体均属同种。

获得定型菌种后,进一步证实济南株与猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*)NCTC 10110同种,L6株与猪鼻支原体(*M. hyorhinis*)BTS-7同种。由此证实我国广泛流行的猪喘气病的原发性病原为猪肺炎支原体,“猪喘气病”即“猪支原体性肺炎”的同义语。

前 言

自从1973年证实我国有代表性的猪喘气病病原济南系是支原体^[1,2,3]以来,国内各研究单位先后从猪呼吸道分离出多株支原体,以期从中筛选适宜于进行菌苗研究的菌株。猪呼吸道存在有不止一种分解葡萄糖的支原体^[14,15,16,17,19],虽然猪肺炎支原体生长特征及致病性,与猪鼻支原体不同,但因软皮体纲具多形性,在人工培养基上继代后,致病性极易减弱乃至丧失。因此,从形态学和致病性方面,不易对两者加以区别。

抗体能单独抑制生长,是支原体区别于细菌的主要之点。Edward等(1954)首先注意到用家兔制备的抗血清。有抑制支原体生长的作用^[17]。Clyde(1964)在此基础上发展了一种生长抑制试验^[8]。国际支原体分类委员会将本法列为法定血清学方法之一。我们于1979年末用干燥圆纸片法得出明确结果。并以定型菌种,制备成抗血清,对我国各地从猪呼吸道分离的支原体进行血清学定型,1980年4月完成,现将工作报告于下:

材 料 和 方 法

一、菌株

本所分离的Z株(济南株),L6、L13株以及经过不同程序纯化处理的Z株—ZS2(三终)、ZS3(三G)和从L6中挑选的不同单菌落—L6G3、L6G13;我国各地从猪呼吸道分离的支原体18株;人和动物呼吸道的定型菌种8种(株),对其中一些菌株进行过形态学和致病性观察。菌种来源及其形态、致病性列于表1,猪喘气病病原支原体的典型多形态见图1。

二、培养基

除BTS-7和S16株以外,各菌株均适应生长于牛心汤复合培养基中^[1],唯将其中乳蛋白水解物的含量,按广西兽医研究所介绍降至0.125%。上述培养基中加入0.8%自

表1 菌株来源、形态及致病性

菌株	略号	形态	致病性*	提供单位
Z固, 三终, 三G	Z, ZS2, ZS3	多形性**	+, +, +	本所
无号F ₁₄	无号	多形性*		江苏省农科院畜牧兽医所
双丰 ₂ F ₂	双丰	多形性*		江苏省农科院畜牧兽医所
安宁系168	168	多形性*		江苏省农科院畜牧兽医所
65F ₄₃	65			江苏省农科院畜牧兽医所
孝F ₁₆	孝	点, 球, 小环	-	江苏省农科院畜牧兽医所
武Ⅰ ₂₂ ⓐA ₆ ⓑB ₆	武Ⅰ ₂₂	多形性		湖北省畜牧特产研究所
武Ⅰ ₂₇	武Ⅰ ₂₇	多形性	+	湖北省畜牧特产研究所
武Ⅳ ₂₀	武Ⅳ ₂₀			湖北省畜牧特产研究所
武Ⅳ ₃₈ ⓐA ₂ —ⓑBF ₅	武Ⅳ ₃₈	多形性	-	湖北省畜牧特产研究所
夏Ⅶ ₂ —冻F ₆	夏Ⅶ	多形性	+	宁夏农科院畜牧兽医所
夏ⅧF ₁₃ —59* ₋₄	夏Ⅷ	多形性	+	宁夏农科院畜牧兽医所
成都2号P5089F ₄	成Ⅰ	多形性	-	四川省农科院畜牧兽医所
LC ₁₀	LC	多形性	+	广西兽医研究所
玉 ₄	玉 ₄			广西兽医研究所
宁 ₃ 肺F ₁₄	宁 ₃	点, 球, 小环		宁夏农学院畜牧兽医系
宁 ₅ 气 ₃₅	宁 ₅	点, 球, 小环		宁夏农学院畜牧兽医系
L6, L6G3, L6G13	同前	点, 球, 小环	S+	本所
L13	同前	点, 球, 小环	S+	本所
HL ₁₈	同前			湖南省家畜疫病防检站
HL ₁₉	同前			湖南省家畜疫病防检站
猪肺炎支原体NCTD 10110	NCTC 10110			农业部兽医药品监察所
猪肺炎支原体J-99	J			日本东京大学农学部
猪肺炎支原体201	201			日本东京大学农学部
猪鼻支原体BTS-7-19	BTS-7	点, 球, 小环		日本东京大学农学部
猪滑液支原体S16	S16			日本东京大学农学部
肺炎支原体FH	FH			上海市卫生防疫站
丝状支原体丝状变种C88	C88			农业部兽医药品监察所
禽败毒支原体S6	S6			农业部兽医药品监察所

* “+”或“-”表示猪喘气病典型的眼观肺炎病灶的有或无。前面加“S”者表示多发性浆膜炎病变。试验猪取自本所培育的无支原体性肺炎猪群, 每批实验均设健康对照组, 与试验组同时扑杀以证实属健康。

**指如文献[14、19、1]所述猪肺炎支原体典型之多形态, 图1。

行纯化的或Oxoid L28琼脂制成的固体培养基供生长抑制试验之用。固体培养基中猪血清的含量增至30%。

BTS-7和S16株生长于日本东京大学尾形学教授介绍的粘液素—精氨酸牛心汤中, 仅将成分稍加改变, 其配方如下: 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, 马血清20毫升, 25%酵母浸液5毫升, 1.25%醋酸铊1毫升, 青霉素1000单位/毫升。加入1%Oxoid L28琼脂所制成的固体培养基供BTS-7生长抑制试验之用。BTS-7及S16株部份生长抑制试验在牛心汤复合琼脂培养基上进行。

三、抗血清

猪喘气病病原支原体Z株, 在制备抗原以前, 经过下列纯化程序: ZF₈冻干菌种在液体培养基中复壮4代(ZF₈₋₄)后, 连续进行3次10⁻¹~10⁻¹⁰稀释继代, 取获得生长的最高稀释度作为下一代的种子。所得的菌株为ZS2, 将ZS2进行3次单菌落移植即为ZS3。ZF₈₋₂、ZS2₋₃、ZS3₋₃均经回归健康仔猪证实具有致病性。ZS2、ZS3的菌

体、菌落形态, 具有猪肺炎支原体的特征。图 1、2。定型菌种在专门的无菌室单独操作, 收到后继代 2 次即作抗原种子。

生长于牛心汤复合培养基中的支原体在 pH 降至 6.7 时收获, 经 13000g 离心 30 分钟, 沉淀物用 PBS 洗 2 次, 浓缩成原容量的 1/100~1/150, 经酚试剂 (或双缩脲) 法测得蛋量为 2.1~3.6 毫克/毫升, 以多次多途径免疫家兔〔5〕, 在进行皮内、肌肉、足垫注射时, 于抗原中加入等量弗氏完全佐剂。所得的高免血清经琼脂双扩散法测得效价在 1:64 以上。

制备的高免血清不抑制异种动物支原体定型菌种和猪体异源菌株的生长, 对相应菌种的抑制圈为 1.6~>4 毫米, 证实了敏感性和特异性。R 8、R 9 抗 ZS 2; R 20、R 21 抗 ZS 3; R 13、R 14 抗 L 6; R 15、R 16 抗宁 3; R 18 抗夏 Ⅷ; R 8302、R 8304 抗猪肺炎支原体 NCTC 10110。

四、生长抑制试验

基本按 Clyde (1964) 圆纸片法〔8〕进行。直径 6 毫米的滤纸片放于平皿中高压灭菌后烘干。每张纸片滴上约 0.2 毫升高免血清, 在 45℃ 中烘 2~3 小时至干。将对数期支原体培养物作 10^{-1} ~ 10^{-3} 稀释, 每皿各接种 3 滴, 使均匀铺开。放上抗血清纸片 (间距不小于 2 厘米), 培养 7~14 天后在低倍显微镜下观察生长抑制情况, 并藉目镜测微器在纸片周围 4 个互相垂直点测得纸片边缘至菌落开始生长间的距离, 取其平均值即为抑制圈的宽度。抑制圈大于 1 毫米者为阳性, 小于 0.5 毫米者为阴性, 在 0.5~1 毫米之间者参照同种及异种对照菌加以判定, 有疑问者进行重复试验。

结 果

一、猪喘气病病原支原体和疑似猪鼻支原体的高免血清对我国猪呼吸道支原体生长抑制试验:

高免血清 R 8、R 9 (抗 ZS 2) 和 R 14 (抗 L 6) 的干燥圆纸片对我国各地从猪呼吸道分离的支原体生长抑制试验结果列于表 2。从表 2 可见 ZS 2 株的高免血清对 LC、夏 Ⅷ、夏 Ⅷ、武 Ⅱ₂₂、武 Ⅱ₂₇、168、65、成 Ⅰ、武 Ⅳ₃₈、双丰、Z 固、无号各株均有 1 毫米以上的抑制圈, 较大者大于 4 毫米, 指示为同种; 而对 L 13、宁 5、宁 3、孝各株的抑制圈, 除了 R 9 抗血清对孝株的 1 次抑制圈为 0.525 毫米以外, 其余均在 0.5 毫米以下, 指示为异种。L 6 株的高免血清对 L 13、宁 3、宁 5、孝各菌株, 除对宁 5 有 1 次抑制圈仅为 0.65 毫米以外, 其余抑制圈均在 1 毫米以上, 说明为同种; 而对 LC、夏 Ⅷ、夏 Ⅷ、武 Ⅱ₂₂、武 Ⅱ₂₇、168、65、成 Ⅲ、武 Ⅳ₃₈、双丰、Z 固、无号各菌株的抑制圈均小于 1 毫米, 其中大部份在 0.5 毫米以下, 说明为异种。

试验结果将我国猪呼吸道支原体从血清学上区分为二个种。

无论 ZS 2 或 L 6 株的高免血清, 对 HL₁₈、HL₁₉、武 Ⅱ₂₀ 三菌株的抑制作用均不明显, 对玉 4 菌株的抑制作用不规律。

二、猪喘气病病原支原体和疑似猪鼻支原体的高免血清对猪呼吸道支原体定型菌种的生长抑制试验。

猪喘气病病原支原体的高免血清 R 8、R 18、R 21 和疑似猪鼻支原体的高免血清 R

表2 ZS2株高免血清R8、R9、L6株高免血清R14对我国猪呼吸道支原体的生长抑制试检

高免血清	试验日期	试 验 菌 株*										
		LC	夏置	夏置	武Ⅱ ₂₂	武Ⅱ ₂₇	168	65	成Ⅰ	武Ⅳ ₃₈	双丰	
抗 ZS2 R8	4/5	>4▲	>4		3.5	>4	>4		>4	>4	>4	2.6
	4/6							>4		>4		
	13/7	>4	2.73	>4	4			3.45	>4		2.775	
	13/9	>4		>4	>4	>4		>4		>4	>4	
	30/11	1.15				3.4	3.0	2.6	2.9	2.625	1.75	
抗 ZS2 R9	4/5	>4	>4		4	>4	>4		>4	>4	3.25	
	4/6							>4		>4		
	13/7	>4		>4	4			1.55	2.45		2.6	
	13/9	>4		>4	>4	>4		0.85		3.7	>4	
	30/11											
抗 L6 R14	4/5	0.175	0.2		0.425	0.175	0.65		0.325	0.125	0.325	
	4/6			0.3				0.25		0.05		
	13/7		0.265	0.225					0.275		0.2	
	13/9	0.6			0.525	0.275		0.475		0.225	0.05	
	30/11	0.275	0.65			0.25	0.35	0.325	0.425	0.45	0.275	
高免血清	试验日期	试 验 菌 株*										
		Z固	无号	L13	宁 ₅	宁 ₃	孝	玉 ₄	武Ⅳ ₂₀	HL ₁₉	HL ₁₈	
抗 ZS2 R8	4/5	2.75		0.475	0.325	0.275		3.5	0.275			
	4/6											
	13/7	>4	3.6	0.35	0.475	0.2	0.45		0.65	0.25	0.425	
	13/9	3.85	>4			0.325		3.3	1.0	0.35	0.275	
	30/11	2.25		0.05		0.2	0.1	0.452	0.65		0.475	
抗 ZS2 R9	4/5	2.25		0.325	0.2	0.2		>4	0.325			
	4/6											
	13/7	2.15	1.575	0.2	0.3	0.2	0.275	>4	0.4	0.3	0.15	
	13/9	1.7	>4			0.15	0.525		0.35	0.325		
	30/11											
抗 L6 Ra4	4/5	0.175		1.05	1.85	3.05		0.125	0.275			
	4/6											
	13/7	0.3	0.325	1.95	0.65	1.25	3.05	0.175	0.45	0.8	2.05	
	13/9	0.475	0.125			1.55	2.55		1.15	0.3		
	30/11	0.65		1.75		1.1	1.6	1.4	0.55		0.425	

*菌种的稀释度为 10^{-2} 。

▲表示生长抑制圈大小的长度单位为毫米。

13、R14、R16对猪呼吸道支原体定型菌种的生长抑制试验结果列于表3。由表3可知各株猪喘气病病原支原体的高免血清对猪肺炎支原体定型菌种NCTC 10110、J、201的抑制圈全部在1毫米以上,大部份大于3毫米,说明为同种,而对猪鼻支原体和猪滑液支原体(*M. hyosynoviae*)的抑制圈全部在0.5毫米以下,说明为异种。

疑似猪鼻支原体各株的抗血清,对猪肺炎支原体和猪滑液支原体的抑制圈全部在0.5毫米以下,说明为异种;而对猪鼻支原体的抑制圈全部大于1毫米,说明为同种图4~9。

表3 猪喘气病病原支原体和疑似猪鼻支原体的高免血清对猪呼吸道支原体定型菌种生长抑制试验

菌 株	高 免 血 清					
	抗猪喘气病病原支原			抗疑似猪鼻支原体		
	R 8	R18	R21	R13	R14	R16
猪肺炎支原体 NCTC 10110-6 NCTC 10110-7 J-3 J-6 J-8 J-2 J-8 201-3 201-10 201-10 201-16	2.15*	3.25		0.25	0.5	
	2.4		1.3		0.275	
	1.6	2.0			0.25	0.025
	2.35	3.55		0.025		0.075
	4.0		> 4	0.175		
	3.45		3.4		0.45	
	> 4		> 4		0.3	
	1.475	> 4			0.025	0.025
	> 4		3.65		0.325	
	> 4		> 4		0.45	
	3.6		3.5		0.1	
猪鼻支原体 BTS-7-4** BTS-7-5**	0.025			2.75		2.25
	0			2.7		1.0
猪滑液支原体 S16-3	0.175		0.450		0.275	

*表示生长抑制圈宽度的单位为毫米。

**表示该平皿中的培养基为粘液素—精氨酸琼脂。

试验结果证实我国猪喘气病病原支原体与猪肺炎支原体同种; 疑似猪鼻支原体与猪鼻支原体同种。

三、用猪肺炎支原体定型菌种NCTC 10110的高免血清鉴定国内猪呼吸道支原体。

定型菌种NCTC 10110高免血清制备好以后, 即用其鉴定国内猪呼吸道支原体。每1培养皿中均放入ZS 2、ZS 3、L 6株的高免血清干燥纸片作为对照, 同时以相应菌种和201作为已知菌种对照, 试验结果列于表4。

由表4可知R 8302、R 8304抗血清纸片对ZS 2、ZS 3、168株的生长抑制圈的宽度最小为2.525毫米, 大部分大于4毫米, 证实为同种(图10); 而对L 6、宁₃、宁₆各株的生长抑制圈宽度全部在0.5毫米以下, 证实为异种。ZS 2、ZS 3抗血清纸片对上述各菌株的生长抑制试验结果与猪肺炎支原体定型菌种抗血清纸片所得的结果相一致。

试验结果进一步证实ZS 2、ZS 3、168株为猪肺炎支原体。

讨 论 和 结 论

支原体分类委员会推荐的鉴定程序是: 分离物经暗视野或相差显微镜判定为多形态, 电镜检查超薄切片证实无细胞壁, 通过不加青霉素和其他制菌剂的培养基不返祖为细菌, 由此将分离物鉴定为软皮体纲、支原体目。然后依据生长是否需要固醇以确定科, 用血清学方法定种^[18]。Blackburn (1972) 提出如果培养物已由生化学和血清学鉴定为一已知种, 则足以证明了^[7]。我们的实验结果猪喘气病病原支原体济南株是猪肺炎支原体种。而济南株与我国六省、市、自治区分离的11株猪喘气病病原支原体同种, 因此认为在我国广泛流行的猪喘气病病原是猪肺炎支原体。

表4 用猪肺炎支原体定型菌种高免血清鉴定我国猪呼吸道支原体

菌 株	抗 血 清				
	猪肺炎支原体				猪鼻支原体 R14 (抗L6)
	R8302 (抗NCTC 10110)	R8304 (抗NCTC 10110)	R9 (抗ZS2)	R21 (抗ZS3)	
ZS2	*2.525~>4	3.25~3.375	3.85	3.75~>4	0.4
ZS3	>4	>4	>4	>4	0.4~0.525**
168	>4	>4	4~>4	>4	0.475~0.625**
NCTC 10110	4~>4	>4	>4	4~>4	0.275~0.425
201	>4	3.9~>4	>4	3.85	0.3~0.475
L6	0.125~0.175	0.175~0.25	0.15~0.475	0.1~0.175	0.95~1.625
宁 ₃	0.075~0.2	0.15~0.375	0.225~0.525	0.2~0.25	0.5~1.175
宁 ₅	0.275	0.1~0.15	0.175~0.225	0.35	0.55~1.2
C88	0.125	0.05	0.075	0.075	0.2
S6	0.075	0.2	0.425	0.2	0.325

*表示生长抑制带宽度的单位为毫米。

**1个平皿中放6张纸片,由于其余5张纸片的抑制圈均大于4毫米或3/4大于4毫米,1/4为4毫米而影响邻近的异种抗血清纸片。

由于血清学上证实自猪喘气病病灶中分离的4株疑似猪鼻支原体即猪鼻支原体,因而说明了猪鼻支原体作为猪喘气病的继发入侵者,在我国也同样存在。

生长抑制试验是以已知的抗血清鉴定培养物,对于待鉴定的支原体不必作任何预处理,因此操作较为简便。有人提到过用生长抑制试验鉴定猪鼻支原体所得的结果不能令人满意^[11, 16]。由于膜的成分发生了变化,当有抗血清存在时,猪鼻支原体可再区分为抵抗抗血清的和对抗血清敏感的2类^[10]。我们用L6抗血清对L13、宁₃、宁₅、BTS-7等菌株进行生长抑制试验时,没有遇到这种麻烦,也许由于培养基成分的差异,补偿了猪鼻支原体抗血清所需的“协同作用”^[16]。鉴于试验中所用猪鼻支原体的菌株较少,加之对于几株从猪呼吸道分离出来的未经其他特性观察的分离物,对上述2种抗血清均不敏感,需以再多一些的猪呼吸道定型菌种进行比较,才能获得明确结果。

下述因素可影响试验结果:接种量过多或纸片潮湿会减弱反应或出现假阴性^[6, 9]。我们也曾遇到未经烤干的抗血清纸片抑制作用不明显的情况。正常生长是抑制作用得以显示的基本条件。L6抗血清对BTS-7株的生长抑制试验,在粘液素-精氨酸琼脂上进行时,抑制圈在2毫米以上,而当在牛心汤复合琼脂上进行时,有时抑制圈小于0.5毫米,因其本身生长贫瘠稀疏,抗血清抑制作用就不明显。纸片间距离过近,抑制圈大的抗血清纸片会影响邻近异种抗血清纸片的结果。如表4中所见那样。

文献上对判定标准不大一致^[7, 9, 13],我们以0.5~1毫米宽的抑制圈为标准,若纸片周围与相应菌种同样有1个清楚的没有菌落或菌落显著稀少的圈,或抑制圈大于0.5~1毫米的为阳性;抑制圈与已知异种菌株同样或小于0.5毫米的为阴性。有疑问的菌种应进行重复试验。

致 谢

衷心感谢日本东京大学农学部尾形学教授友好地赠送给我们猪肺炎支原体J株201株、猪鼻支原体BTS-7株,猪滑液支原体S16株。广西兽医研究所猪喘气病组的同志们为我们进行ZS2的单菌落移植,仅此致谢。

参 考 文 献

- [1] 上海市农业科学院畜牧兽医研究所(1973)猪喘气病病原的研究 I, 病原支原体在无细胞培养基中的生长与特性。1973年农业科学研究报告汇编, 20~29。
- [2] 上海市农业科学院畜牧兽医研究所(1975)猪喘气病病原体的分离培养。微生物学报15(4)302~309。
- [3] 周翠堤 许日龙 刘瑞三 陈嘉律(1973)猪喘气病病原体的研究(1)支原体的无细胞培养。1978年度上海市畜牧兽医学会年会论文集53页。
- [4] 周翠堤 张惠英(1978)猪喘气病病原支原体鉴定探索: 溶血及血球吸附活力初步观察。1978年度上海市畜牧兽医学会年会论文集54~59。
- [5] 徐礼周(1980)猪支原体地方菌株高效价免疫血清的研究, 1980年中国畜牧兽医学会年会论文集摘要集(兽医部分)23页。
- [6] Bailey, J.S., Clark, H.W., Felts, W.R., and Brown, T.McP., (1963)Growth inhibitory properfies of mycoplasma antibody. J. Bacteriol. 86: 147~150.
- [7] Blackburn, B.O., (1972)Laboratory Diagnosis of Mycoplasmosis in Food Animals. 118~126. in (Proc. 19th. Annu. Meet.) Ammer. Assoc. Vet. Laboratory Diagnostician.
- [8] Clyde, W. A. Jr., (1964)Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera. J. Immunol., 92: 958~965.
- [9] Crawford, Y.E., (1970)Mycoplasma.in (Manual of Clinical Microbiology. 251~262) .
- [10] Dinter, Z., (1969)Susceptibility and resistance of various strains of Mycoplasma hyorhinis to antisera. polymyxins and low pH values. J. gen Microbiol. 57: 263~272.
- [11] Dinter, Z., Danielsson, D., and Bakos.K., (1965) Differentiation of porcine mycoplasma strains., J. gen. Microbiol. 41: 77~84.
- [12] Edward, D. G. ff., and Fitzgerald, W. A., (1954) Inhibition of growth of pleuropneumonia Like Organisms by antibody. J. Pathol. Bacteriol. 68: 23~30.
- [13] Goodwin. R. F.W., Pomeroy. A. P., and Whittlestone. P., (1967)Characterization of Mycoplasma suipneumoniae: a mycoplasma causing enzootic pneumonia of pigs. J. Hyg. Camb.65: 85~96.
- [14] L'Ecuyer, C., (1969)Enzootic pneumoniae of Pigs: Propagation of pathogenic mycoplasma in tissue culture and artificial medium. Cana. J.Comp. Med., 30: 10~19.
- [15] Pijoan, C.(1974)Secretion of hydrogen peroxide by Some common pig mycoplasmas. Vet. Rec. 95: 216~217.
- [16] Roberts, D.H., (1971)Brit. Vet. J. 127: 582~586.
- [17] Switzer, W. P., and Ross, R.F., (1975)Mycoplasma Diseases. in (Disease of swine) 4 th. edition. 741~764.
- [18] Tully, J. G., and Razin, S., (1971)The Mollicutes. in (CRC Handbook of Microbiology) 2nd editien. Vol. 1: 405~410.
- [19] Whittlestone, P.,(1973)Enzootic Pneumoniae of Pigs., Adv. Vet. Sei Comp.Med. 17: 1~56.

SEROLOGICAL IDENTIFICATION OF PORCINE RESPIRATORY TRACT
MYCOPLASMAS IN OUR COUNTRY

Zhou Cuidi Chen Jiadi Li Jishen

(*Animal Husbandry and Veterinary Medicine Research Institute,
Shanghai Agricultural Academy*)

Summary

21 strains of mycoplasma isolated from respiratory tracts of swine from six provinces, municipalities or autonomous regions of our country were identified serologically and proved to belong to two species by the method of dry paper discs growth-inhibition test, using antisera to Jinan strain isolated from pigs with "Swine Asthma" and to a Mycoplasma hyorhinitis-like strain L6. 12 strains of "Swine Asthma" pathogen of the 21 were of the same species.

Jinan strain was proved to be identical with the type culture NCTC No 10110 of *M. hyopneumoniae*, and the strain L6, with the BTS 7 of *M. hyorhinitis*. The original causative agent of "Swine Asthma", widespread in our country, was thus demonstrated to be *M. hyopneumoniae*.