

558.24-6
1.

猪地方性肺炎的病原和诊断

上海农业科学研究院畜牧兽医研究所

上海科学技术情报研究所

猪地方性肺炎的病原和诊断

上海农业科学研究院畜牧兽医研究所

*

上海科学技术情报研究所出版

新华书店上海发行所发行

上海商务印刷厂印刷

*

开本: 787×1092 1/16 印张: 1.5 字数: 31,000

1974年1月第1版 1974年1月第1次印刷

印数: 1—35,700

代号: 151634·155 定价: 0.20 元

(只限国内发行)

S 8

毛主席语录

路线是个纲，纲举目张。

鼓足干劲，力争上游，多快好省地建设社会主义。

我们不能走世界各国技术发展的老路，跟在别人后面一步一步地爬行。我们必须打破常规，尽量采用先进技术，在一个不太长的历史时期内，把我国建设成为一个社会主义的现代化的强国。

中国人民有志气，有能力，一定要在不远的将来，赶上和超过世界先进水平。

目 录

病原的一般特性	(1)
1. 形态	(1)
触片所见形态	(1)
肺脏切片	(2)
盖玻片观察	(2)
电子显微镜检查	(2)
滤过性	(3)
2. 对抗菌素和药物的敏感性	(3)
分离培养的方法	(4)
1. 培养基和培养方法	(4)
2. 培养物的纯化	(7)
3. 培养物的保存	(7)
猪地方性肺炎的诊断	(7)
1. 病理组织学检查和鉴别诊断	(8)
2. 血清学诊断方法	(9)
生长抑制和代谢抑制试验	(9)
血凝和血凝抑制试验	(10)
补体结合试验	(12)
凝胶扩散试验	(14)
免疫荧光诊断	(16)
凝集试验	(16)
胶乳凝集试验	(17)
关于免疫试验的情况	(17)
主要参考文献	(19)

猪地方性肺炎的病原和诊断

猪地方性肺炎广泛存在于世界各地,很长时期以来,人们一直认为此病系由巴氏杆菌或其他细菌,如链球菌、棒状杆菌所引起。一九三〇年起,由于 Shope 对猪流感病毒研究的结果,人们又多认为此病即是猪流感或副流感。本世纪五十年代初期,大量的研究报告证明疾病的病原是一种病毒,故一度又称之为猪病毒性肺炎。与此同时,也有人怀疑疾病的病原不是病毒,例如 Betts 和 Beveridge (1952) 即认为其病原与小白鼠的灰肺病和人的非典型性肺炎有关,首次提出病原可能为支原体。一九五六年左右,Whittlestone 等曾在病肺观察到并分离出多形态的类胸膜肺炎微生物,但因未排除其他因素而不能肯定其为支原体。

一九六五年,美国的 Lam 和 Switzer 及英国的 Goodwin 等一致证明猪地方性肺炎的病原是猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae* 或 *M. suis pneumoniae*)。目前,在二十一个国家或地区已分离到此支原体,而在丹麦和法国还分离到不同于上述品系的猪肺炎支原体。此外,在猪体、甚至在呼吸道还分离到另外一些致病性或非致病性支原体,如猪鼻支原体(*M. hyorhinis*)、猪滑液支原体(*M. hyosynoviae*)、猪关节支原体(*M. hyoarthrinosa*)以及腐生性的莱氏衣原体(*Acholeplasma laidlawii*)、粒状衣原体(*A. granulorum*)。其他动物的支原体,如鸡的禽支原体(*M. gallinarum*)和乏支原体(*M. iners*)也从猪体分离出过。Dinter (1965)由猪分离到的 B₃ 型,经电子显微镜观察,其形态很象牛胸膜肺炎微生物(Fully 和 Ragin, 1968)。

一九六七年,Edward 和 Freundt 建议为支原体建立新纲 *Mollicutales* (已被采用)。纲下设支原体目(*Mycoplatales*),支原体科(*Mycoplasmataceae*)。支原体科有两个属,支原体属(*Mycoplasma*)和衣原体属(*Acholeplasma*)。在支原体属下,现已知有三十多个种。

支原体是一群介于细菌和病毒之间的多形性微生物。它与细菌的区别在于它没有细胞壁,也没有细胞壁粘肽或其先质,能通过一般细菌滤器(这点常导致与病毒相混淆)。支原体与病毒和立克次体不同之处,是它可以在无生命的培养基中生长繁殖。

支原体能引起人和动物的各种疾病。现已证实人原发性非典型性肺炎、牛传染性胸膜肺炎、山羊传染性胸膜肺炎、猪地方性肺炎、家禽慢性呼吸道疾病及传染性山羊和绵羊缺乳症等,均由支原体所引起。

病原的一般特性

1. 形态

(1) 触片所见形态

将病肺触片在空气中干燥,用甲醇固定 2 分钟,再用以 pH7.2 的磷酸盐缓冲液作 1:20 稀释的吉姆萨染色剂染色 3 小时,在冲洗、干燥后立即用丙酮浸洗一次,镜检时在触片中观察到呈红紫色的、比细菌着色浅的多形性微生物(见图 1)。其形状主要为球状(直径 0.2~0.5 微米)、环状(0.5 微米)、椭圆或两极形(长 0.5~1.0 微米)、直杆或弯杆状(0.3~1.0 微

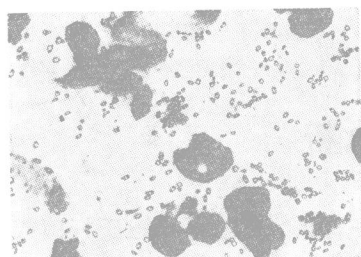


图1 吉姆萨氏染色之猪地方性肺炎病肺组织触片；可见环形和两极形的猪肺炎支原体 $\times 750$

米)、三角形(角落浓厚),几乎全部在细胞外,偶见在多形核白血球的胞浆内(Whittlestone, 1967)。

Mare 和 Switzer (1966) 用大致相同的方法检查了病肺触片,所看到的微生物以球形为主,亦见少数环状的(直径为 $0.3 \sim 0.5$ 微米)、呈深兰紫色的微生物。它常见于细胞外,偶见附着于细胞表面或巨噬细胞的胞质内。

(2) 肺脏切片

Mare 和 Switzer (1966) 在病肺切片中观察到与在触片所见相同的微生物。常见其位于支气管上皮表面,但亦有见于肺泡内的,较少见于肿胀的隔细胞内。经支原体接种三周后,所采集的标本检出率较高,接种5周后未发现上述微生物。

(3) 盖玻片观察

在猪肺炎支原体液体培养时,将盖玻片放入。当培养基的 pH 降到 $6.9 \sim 7.0$ 时取出盖玻片。与制触片同法固定染色,然后进行显微镜观察,低倍镜检查到的为大菌落,油镜检查所见的为小菌落。菌落主要是由串在细丝上的球菌(直径 0.3 微米),或由环状和两极形等不同形态的微生物所组成,但有时也能见到巨大的球体, (Goodwin 和 Whittlestone, 1966)。液体培养物经离心,从沉淀物切片亦能见到其形态的多式多样(见图2)。

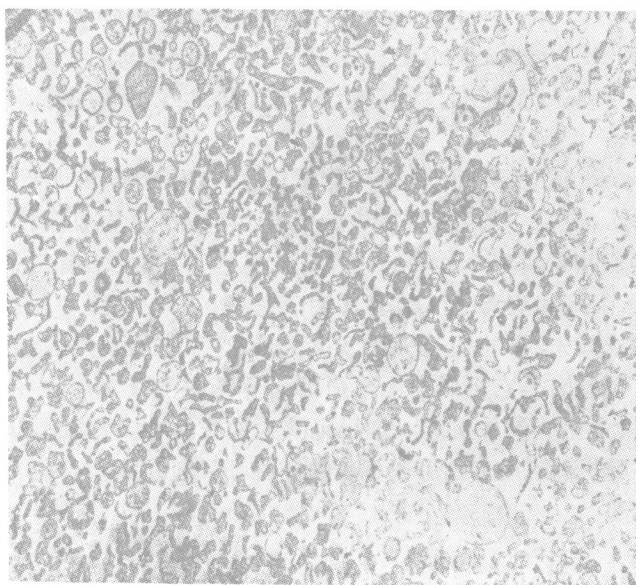


图2 猪肺炎支原体离心沉淀物切片,可见其形态的多式多样 (Whittlestone 等, 1969) $\times 3600$

(4) 电子显微镜检查

病肺组织超薄切片用 1% 四氧化锇固定,继用甲丙塑料-二乙烯基苯或树脂包埋, 1% 醋酸铀染色。电子显微镜检查时可见超薄切片中隔细胞增多并变大,且常见于肺泡腔内,所见微生物直径是 $200 \sim 300$ 毫微米(此或即是病原体)。按其大小和形态,与砂眼病毒和脑膜肺炎的单体非常接近。这两种病毒属于鸚鵡病毒组。鸚鵡病毒所特有的细胞内繁殖阶段,

在猪地方性肺炎制备物中没有看到。

病肺细胞培养物用机械方法取得, 处理方法同上。电镜检查示出培养物存在大量与在猪肺炎肺超薄切片中隔细胞内所见到的相似的胞质内包膜嗜银体, 直径为 200~450 毫微米, 偶见嗜银体有密集的核结构和膜状螺环, 类似细菌的核内体 (Mesosomes)。

Fallon 和 Whittlestone (1969) 阐述了在超薄切片中支原体显示出的厚度约为 7 埃; 特征性的三层细胞膜中, 中层细胞膜的电子密度要比内层和外层小。

(5) 滤过性

Marc 和 Switzer (1966) 用分级火棉胶膜滤过病肺悬液, 结果病原能通过平均孔径为 650、450 和 300 毫微米的滤膜, 但为 220 毫微米滤膜所阻留。根据 Elford (1933) 的仿算法, 估计病原体的大小为 110~225 毫微米。

2. 对抗菌素和药物的敏感性

Marc 和 Switzer (1966) 证实猪地方性肺炎病原体对乙醚和金霉素敏感, 但能抗泰乐菌素。Huhn (1971) 发现猪肺炎支原体对金霉素敏感, 但对泰乐菌素酒石酸盐及红霉素有抵抗力。Früs (1971) 发现培养基中加入了青霉素 G 能抑制猪肺炎支原体生长, 将杆菌肽 (bacitracin) 和美特霉素 (Meticillin) 并用, 亦有抑制猪肺炎支原体生长的作用。

来自猪体的猪肺炎支原体和猪鼻支原体对各种抗菌素和硝基呋喃的敏感性, 列于表 1。

表 1 猪支原体对抗菌素和硝基呋喃的敏感性 (尾形等, 1969)

药 物		<0.0064	0.032	0.16	0.8	4	20	>100
四环素	四环素			A, ②	B, ③	E		
	金霉素 Adramycin			A	B, C, D	A, B, ②	③, E E	
macrolide	泰乐菌素			A, ②, ③, E	B			
	红霉素			E			A	A, ②, ③
	柱晶白霉素 螺旋霉素			A	A, B, ②, ③ B, ②, ③, E	E		
肽	放线菌素-D	②, ③	E	A, B				
	复合美加霉素 波卓霉素			②, ③	A, B	E A, B, ②, ③	E	
氨基糖苷	链霉素						E	
	卡那霉素				A, B		②, ③, E	
	新霉素					B	A, ②, ③, E	
其 他	嘌呤霉素				A, B, ②, ③	E		
	氯霉素					A, B, ②, ③	E	
	Lincomycin			C, D	A, B, E			
	丝裂霉素-C morimycin	B, ②, ③	A	E	A, B	②, ③, E		
硝呋 基喃	NF-161		A, B, ②, ③		E			
	NF-620	A, B, ②, ③			E			

A: 猪鼻支原体 (Switzer)

②: 猪肺炎支原体 (Switzer)

E: 粒状支原体

B: 猪鼻支原体 (Estola)

③: 猪肺炎支原体 (SEP46-4)

分离培养的方法

猪肺炎支原体的分离较之猪呼吸道其他支原体,如猪鼻支原体、B₃支原体等要困难得多,因为它对营养的要求苛刻。当培养基质量欠佳,不能满足其生长的全部要求时,就会使分离工作失败;或当标本中混有他种支原体时(最常见的是猪鼻支原体),由于继发性入侵者的存在常常影响了原发性病原的分离。因此,要成功地分离培养猪肺炎支原体,必须要用理想的培养基;至于从野外病例进行支原体分离时,还须同时注意抑制非致病性支原体的生长。

猪肺炎支原体在常规的支原体培养基(如 Edward 培养基)中不能生长。在猪地方性肺炎病原研究史上,错误的病毒学说之所以能够支持这么久,这也不能不算是一个原因。

1. 培养基和培养方法

Goodwin 和 Whittlestone (1964, 1966) 使用的煮沸细胞培养基配方如下:

无地方性肺炎猪血清	20%
5% 乳蛋白水解物	10%
Hanks 液	70%
酵母浸出液 (Difco)	0.01%
青霉素	200 单位/毫升

倾去细胞培养管中营养液,加入磷酸盐缓冲液,将细胞培养管放在沸水中 30 分钟,后用上述营养液换掉磷酸盐缓冲液,即可作接种用。

煮沸细胞培养基为当时分离猪肺炎支原体的理想培养基,猪肺炎支原体在这种培养基上生长比在无细胞培养基上生长旺盛。Goodwin 等认为,这可能是因为煮沸后的细胞增加了培养基的营养成分,或细胞碎片所起的机械作用,也许是破坏了某种抑制成分之故。Goodwin 和 Whittlestone (1964) 用以分离猪肺炎支原体的液体培养基,Goodwin (1965~1967) 又作了一些改进。1970 年报告中仍用这种培养基,其配方如下:

猪肺汤或 Hartley 肉汤 (经高压)	300 毫升
50 克/公升乳蛋白水解物 Hanks 液 (经高压)	100 毫升
无地方性肺炎猪的血清 (56°C 灭活半小时)	200 毫升
Hanks 平衡盐溶液 (120°C 高压灭菌 10 分钟)	400 毫升
酵母浸出液	5 毫升
青霉素	200 单位/毫升
醋酸铊	0.125 克/公升
过滤除菌	

猪肺汤制法是将无地方性肺炎的猪肺捣碎,加二倍于猪肺重量的水,置于 4°C 过夜,肺悬液用两层纱布过滤,滤液煮沸 15 分钟,再次用纱布过滤,以后将滤液经 900 转/分离心 20 分钟,收取上清液,并经高压灭菌 (110°C, 30 分钟),菌检后即成。

酵母浸膏制法如 Herderschee (1963) 所述。将 Baerks 酵母加入等量的水,再加 30% 盐酸调节 pH 至 4.5, 80°C 下置 20~30 分钟。

培养基的最后 pH 为 7.6 左右。培养基储藏于 -25°C 备用。每批培养基均用冰冻保

存的猪肺炎支原体做生长滴度,连传三代,以鉴定生长是否满意。

在上述培养基中加入 1% Oxoid Ionagar 2 号,即成固体培养基。

液体培养是在 37°C 进行转管培养。猪肺炎支原体在这种培养基中生长时产酸,在生长最好的培养物中,偶尔可见到乳白色。固体培养是在潮湿的含有 5~10% 二氧化碳的大气中进行。培养至 3 天时,菌落的直径为 20~100 微米,培养至 7~10 天时,菌落最大直径可达 400 微米。菌落无中心乳突,老龄菌落中心略呈凹陷。菌落触片用吉姆萨染料染色,显示多形性单体。据说,生长在固体培养基上的猪肺炎支原体的致病力比生长在液体培养基中的差。

Mare 和 Switzer (1966) 报道过他们比较了猪肺炎支原体在几种人工培养基上生长的情况。这几种培养基是: (1) 牛心浸液 (BHI) 火鸡血清培养基(这种培养基用于常规繁殖猪鼻支原体和粒状支原体) (2) 火鸡肉浸液火鸡血清培养基 (3) 磷酸盐缓冲液 (DPB) 中加入乳蛋白水解物 0.5%、Difco 酵母浸出液 0.01% 和猪血清 20% 的培养基。上述培养基加入 1% Difco Noble 琼脂后即成固体培养基 (4) 1:1 DPB 基础培养基加 BHI 火鸡血清培养基。比较结果表明,猪肺炎支原体在 DPB、BHI 混合培养基中生长最好,而且稳定。接种后二天能见到乳白色,摇动时略呈螺旋形上升的特征。生长五天时,培养基的 pH 从 7.5 降至 6.7。猪肺炎支原体在 BHI 火鸡血清培养基及火鸡肉浸液培养基中均不生长。在 DPB 琼脂平碟中生长较好,围绕着细球菌属的保姆菌呈卫星状生长。培养二天时,菌落直径达 50~100 微米。3~4 天时,见菌落中央突起。6~10 天偶见菌落能在无保姆菌的琼脂表面生长。然而,通常在无细球菌属时不生长。

Lam 和 Switzer (1971) 报道用间接血凝诊断猪支原体性肺炎。制备抗原用的猪肺炎支原体是生长和繁殖在上述 DPB 基础培养基上的(培养基略有改变,将 0.01% Difco 酵母浸液改为 1% Hayfick 酵母浸液,另加 0.5% 葡萄糖)。

Switzer 最近 (1972) 所使用的培养基配方如下:

最小限度必要培养基 (Eagle)	9.8 克
离子交换水	1000 毫升
羟基哌嗪乙烷乙磺酸(N-2-hydroxyethyl piperazine-N-2 ethane sulfonic acid)	5.96 克
乳蛋白水解物(酶催化的)	5 克
酵母浸计	5 毫升
用酸调节的猪血清	200 毫升
用 1 当量的氢氧化钠把 pH 调节到 7.6	
过滤灭菌	

采用每分钟 12 次的水浴震荡培养法能使收获量增加。培育三天后, pH 会降低到 7.0 或 7.1, 有一定程度的混浊, 生长滴度约为 10^{-8} 。

由于在猪呼吸道存在着一种以上的支原体,因而有必要改进培养基,使其具备更好的选择性。英国剑桥大学兽医系几年来从液体培养基中分离猪肺炎支原体的成功率,按地方性肺炎的病例和爆发次数计算,分别为 13% 及 18%。Goodwin 和 Hurrell (1970) 详述了该实验室以同样的标准,将分离率分别提高到 45% 及 75%。分离率的提高是由于下述原因: (1) 每份标本的各种稀释度均用双份,并且延长了初次分离培养的时间 (2) 改进培养基,包括改善猪肺炎支原体的生长以及选择性地抑制猪鼻支原体的生长;据观察,不同批的血

清, 对猪肺炎支原体和猪鼻支原体的生长影响显著不同。Oxoid 出品的 Hartley 氏肉汤比自制的质量好, 生长速度要快得多。这一情况在培养猪肺炎支原体时要比培养猪鼻支原体时更为明显。用剑桥自制的酵母浸出液与市售 Difco 牌号的相比, 自制的似略改进了猪鼻支原体的生长, 而对猪肺炎支原体的生长则无差异。两种支原体在含或不含有醋酸铊的培养基中生长同样良好。曾对抑制猪鼻支原体生长作了一些尝试, 观察到 20% 猪血清有利于猪鼻支原体的生长, 但如减少猪血清而代之以马血清则会抑制猪鼻支原体的生长, 其原因尚不清楚。还试用了两种选择培养基, 一种含有 5% 猪血清和 15% 马血清, 另一种含有 6% 猪鼻支原体的抗血清 (效价为 1/64, 猪血清) 和 14% 马血清。结果表明, 这两种培养基对猪肺炎支原体的生长均较有利。尤其是后一种培养基, 当接种 10^{-1} 猪肺炎支原体及 10^{-2} 猪鼻支原体时, 曾产生了猪肺炎支原体。而在一般液体培养基中, 猪肺炎支原体的接种量要超过猪鼻支原体 100,000 倍时, 猪肺炎支原体才能生长。由于健康猪血清中存在着非特异性抑制物质, 同时人工免疫产生的抗体效价低且下降快, 以及部分猪经猪鼻支原体接种后, 血清中会产生猪肺炎支原体的抑制物质等原因, 故抗血清的制备相当的困难。由于制备家兔抗血清的困难, 所以有人认为猪肺炎支原体不是一种抗原性很强的支原体。

山本孝史等(1971)也认为, 历年来野外病例的猪肺炎支原体分离率非常低, 这是因为有猪鼻支原体繁殖之故。在地方性肺炎病灶中, 猪鼻支原体的存在率很高, 造成了猪肺炎支原体分离的困难。山本孝史等将猪鼻支原体抗血清和卡那霉素并用, 抑制了猪鼻支原体的繁殖而使猪肺炎支原体分离培养成功。培养基(LGM-5 培养基)的成分如下:

Hank's 液	50 毫升
Hartley's 肉汤	30 毫升
乳蛋白水解物	0.5 克
猪血清	20 毫升
25% 酵母浸出液	5 毫升
2.5% 醋酸铊	1 毫升
青霉素	1,000 单位/毫升

将 20~30% 肺病灶悬液 2 毫升与 5 株猪鼻支原体抗血清 (各为 1/80) 2 毫升混合, 于室温中放置 2 小时, 以 3,000 转/分离心 5 分钟, 然后将 1/10 和 1/100 的上清液分别接种到加有抗血清 (1/200) 的 LGM-5 培养基和同时加有抗血清 (1/200) 及卡那霉素 (微克/毫升) 的 LGM-5 培养基上, 于 37°C 进行培养。

上述选择培养基试验的结果: 34 份猪肺炎标本中有 31 份分离出猪肺炎支原体, 17 份分离出猪鼻支原体。19 例眼观正常的肺组织, 都未能分离出猪肺炎支原体, 仅其中 3 例分离出猪鼻支原体。同时实验还证明: 使用卡那霉素和抗血清进行选择分离时, 在培养基上的接种量以 1/100 为最好。需要补充说明的是, 猪肺炎支原体和猪鼻支原体对卡那霉素敏感试验所用的培养基是相同的。山本孝史等还认为 GIT、MIT 培养基都具有稳定的生物性状, 如猪肺炎支原体在固体培养基上所显示的发育性状等, 所以认为它们用于支原体的鉴定是有效的。当然, 致病性也是一个鉴定依据。

在丹麦, Friis (1971) 鉴于环丝氨酸对猪鼻支原体具有选择性抑制作用, 所以试用含环丝氨酸 0.5 毫克/毫升和 5% 猪鼻支原体抗血清的培养基来分离猪肺炎支原体。在屠宰的患有卡他性肺炎的肉猪中, 有 95% 的病例分离出了猪肺炎支原体。

2. 培养物的纯化

由于在猪的呼吸道内至少存在着 4 种支原体,所以在制备抗原制造诊断血清和鉴定培养物之前,有必要纯化培养物。曾发现看上去是单个菌落,但其中却存在着几种支原体。纯化的方法是用金属针刺入单个菌落中心,取材移种,或在解剖显微镜下用针头或巴氏吸管挑出琼脂上的菌落,连同琼脂一起划线于平皿上。更好的方法是将菌落乳化于肉汤中,连续稀释到 10^{-4} , 然后再接种到平皿上。菌落必需再连续纯化两次,以便最后得到纯菌落。

猪肺炎支原体的纯化比较困难,因为它的培养条件比其他的支原体更严格。初次分离时在固体培养基上生长不是最好,因而很难得到纯培养。然而,只要知道所要排除的支原体菌种以后,就可在固体培养基中加入相应的抗血清;更简单的是将浸透抗血清的圆纸片放在培养基上,象纸片生长抑制试验那样,以抑制不需要的支原体。这样,在圆纸片附近就可以得到纯培养。但是对于猪鼻支原体,不能采用此法,因为有些菌株能在浸有抗血清的纸片附近生长。这种现象,有人解释为抗原性的不同,有人解释为由于支原体的膜的成分变化之故。Roberts 和 Pijon (1971) 报道,在琼脂培养基中,用新鲜的不加热的马血清取代商品的不加热马血清 (Wellcome 3 号),用纸片生长抑制试验能够为新分离的 10 株对抗血清有抵抗力的和 5 株敏感的猪鼻支原体定型。作者认为,这是由于抗猪鼻支原体血清与新鲜马血清结合可出现协同作用 (Synergistic effect),因而能抑制猪鼻支原体菌落的生长。从以上实验中可以得到这样的启示:用新鲜不加热的马血清制备培养基,有助于从混有猪鼻支原体的标本中获得猪肺炎支原体的纯培养。新鲜马血清的制备方法是在 3 公升全血中加入 30 毫升 10% 草酸钾,后置于室温过夜,次日吸出血清,每公升血清加 30 毫升 4% 氯化钙,然后用力扰动直至纤维分出。吸取血清置室温过夜,离心后用蔡氏滤器过滤,贮藏在 -20°C 备用。

固体培养基中的支原体菌落,易与细菌和假菌落相混淆,应注意加以区别。

细菌 L 型菌落和支原体菌落在形态上极相似。但前者有较暗的中心,其周围颜色较浅呈粗糙花边状。培养数天后菌落可达 0.5 毫米。移种到无抗菌素的培养基中,能还原为正常细菌形状。洋地黄皂苷能溶解支原体,而细菌 L 型能抗这种溶解。支原体有些菌株的 DNA 中乌(便)嘌呤+胞(核)嘧啶的百分率比任何细菌都低。

在固体培养基上,很小的细菌菌落可能很象支原体菌落。但细菌菌落多半没有中央乳突,不透明,几乎都可以从琼脂表面上擦去。支原体菌落往往埋入琼脂表面。两者可用狄乃氏染色法加以鉴别。支原体菌落用此法染色能明显着色,有深蓝色中心。琼脂及细菌染色后呈浅蓝色,且活细菌在染色 30 分钟后即能脱色。

3. 培养物的保存

支原体象细菌一样可以连续通过固体或液体培养基传代保存。但因有受到其他支原体和细菌污染的危险,故一般不用此法保存。在 $-60\sim-75^{\circ}\text{C}$ 中,液体培养物或带菌落的琼脂可以保存 12 个月以上,有时甚至可达数年。在 -25°C ,培养物能存活数月。Goodwin 用以试验培养基质量的猪肺炎支原体即为冷冻保存的。如将培养物冻干后保存于 -65°C 或 -26°C ,培养物能存活 3~4 年。

猪地方性肺炎的诊断

Grace 等 (1963) 认为根据临床病史、眼观和镜检病变,即可对猪地方性肺炎予以确诊。

但这只有在大群发病情况下有用处。X 光透视(或拍片)虽然快速简便,但在大群发病时普查就具有一定的困难,而且无法查出隐性感染的带菌猪来。若由猪体分离出支原体,不但能观察其形态和测定其毒力,而且也可以鉴定其血清型,方法前已叙述。这里拟重点介绍病理学检查和鉴别诊断,以及血清学试验方法。

1. 病理组织学检查和鉴别诊断

Betts (1952) 报道过猪地方性肺炎的大体病变为肺尖叶和心叶有边缘清楚的暗紫色或带灰色、类似膨胀不全的肺炎区。其他肺叶也可能受到影响,但一般较少波及。

Pattison (1956) 描述了镜检组织病理学的演变过程。开始时,肺泡间组织的细胞增殖,同时有轻度水肿,在肺泡腔内有少量的游离大单核细胞。以后,支气管和细支气管常有细胞液渗出,比较明显的水肿,以及显著的淋巴组织增生现象。结果,支气管和细支气管周围大量积聚的淋巴细胞可使一定区域的肺泡组织结构消失。很少发现嗜中性白血球。显然,在没有肺泡反应的情况下,能够发生淋巴组织增生。同样也观察到肺小叶组织萎缩,没有伴同的炎症反应(萎缩区常在气肿区邻近),未发现支气管壁有相应病变。以后的一些研究报告所报道的有关猪地方性肺炎的巨检和显微的病变,一般都与上述描述相同。

Hodges (1969) 报道了实验感染猪肺炎支原体的病猪病理变化,包括淋巴细胞和浆细胞浸润,支气管周围网状霉素量增加,以及细支气管腔内出现嗜中性白血细胞和单核细胞。病变另一特征是呈明显的中隔细胞反应和在肺泡内充满富有蛋白质的液体。

猪地方性肺炎常易与其他原因引起的肺炎相混淆,如何鉴别甚属重要 (Switzer, 1964)。尾形 (1969) 曾制有猪肺炎病原示意图(图 3)。

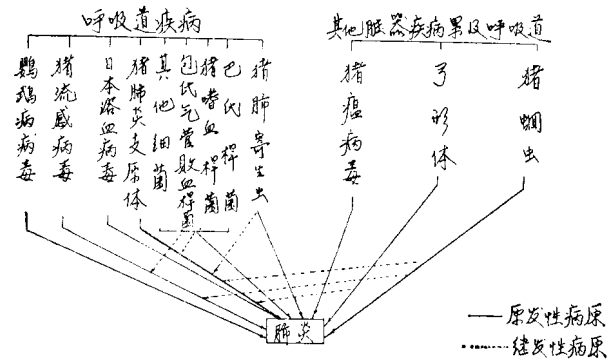


图 3 猪肺炎病原示意图

有关猪流感和地方性肺炎的鉴别诊断, 早年已有多人论述过。真正的猪流感是急性传染病, 潜伏期 2~4 天, 临床呈体温升高和极度衰竭 (Shope, 1931)。而猪地方性肺炎则是慢性病, 潜伏期 10~16 天, 体温仅略有升高, 症状轻微或无症状表现, 临床特点是慢性、非产生性干咳。猪流感季节性明显, 多发于秋冬之际, 而猪地方性肺炎的发生则不受季节限制。猪群病史对诊断具有参考价值, 如猪群有慢性呼吸道疾病, 并持续几个月或几年之久, 则疾病多半是猪地方性肺炎, 病毒可在母猪和后备公猪肺中存留若干月。由于母猪患病, 幼猪群又可能经母猪哺乳而产生感染, 遂使此病在猪群中连绵不绝。与此相反, 猪流感病毒只能在肺中存留几天, 病后即具免疫性, 很少发现有带毒的猪只。但如果免疫力消失之后, 猪只仍可能被重新感染上猪流感。由于检疫不严, 新的种畜引进常能引起猪地方性肺炎, 而猪流感并不

如此,由猪流感病毒引起的慢性呼吸道疾病却属少见。猪地方性肺炎发病率极高,猪流感则低于10%。此外,二者的组织病理学也不同。据观察(Urman, 1958),在接种猪流感病毒后24小时,即能见到整个猪肺呈现散在的水肿和充血区,第三天,肺泡和支气管内有众多嗜中性细胞,多处有细胞残渣;第四或第五天,可见明显的变性和再生变化;接种后第六天,单核细胞血管周围反应较细支气管周围明显,其后细支气管周围“袖套”现象成为主要病变。实变区膨胀不全,有些支气管内有细胞残渣,气管上皮细胞变性或坏死。这些都是猪流感与地方性肺炎不同的地方。

包氏气管败血杆菌(*Bordetella bronchiseptica*)引起的肺炎,其最明显的肺病变是血管变化、纤维化,肺泡水肿,严重出血。继早期血管炎后,出现内皮细胞肥大增生以及中层和外膜增生。在血管变化之后,血管周围、细支气管周围、肺胸膜下和纵膈区出现纤维化,纤维组织代替了肺实质细胞;后期可见肺泡上皮形成。这些组织病理学变化都与猪地方性肺炎不同(Ducan, 1965; Ducan 等, 1966)。

巴氏杆菌所致肺炎,病变是整个肺部都有嗜中性细胞反应和中隔细胞增生。Roberts等(1962)发现,分离出猪鼻支原体的病肺没有明显的组织学变化。巴氏杆菌引起的肺炎,病肺镜检89%有淋巴反应,与猪地方性肺炎相同。因此,据认为野外病例中猪肺炎支原体是原发性的病原,其他微生物则为继发性的入侵者。

2. 血清学诊断方法

人和动物感染了支原体后都有抗体反应。现已查知某些支原体抗体产生的过程与类型。含有活细胞的抗原,其补体结合和生长抑制反应的滴度比用碎菌抗原所得的滴度为高。有的动物的抗体是7S(IgG球蛋白),也有些动物的抗体是9S(IgM球蛋白)。这些抗体在各种血清学反应中具有活性,包括间接血凝、补体结合、生长抑制、代谢抑制、沉淀试验、凝集试验和免疫荧光反应。这一类方法已逐步应用于支原体疾病的诊断,目前发展很快。

(1) 生长抑制和代谢抑制试验

生长抑制试验,包括加补体或不加补体,都是较敏感和特异的。该试验系根据葡萄糖、精氨酸和尿的代谢被抑制情况来推算生长抑制(Purcell等, 1966)的情况。如果某种支原体能发酵葡萄糖,则观察发酵反应是否产酸,若不产酸即系被抑制。Goodwin等(1967)和Hodges和Betts(1969)都发现免疫血清可以抑制猪肺炎支原体的产酸作用;日本的高取(1969)也有相同报告。但Switzer(1972)用高取的方法未能重复成功。Morton(1966)认为此法的缺点是对正常菌株(eugonic strains)的生长抑制要比对发育不全菌株(dysgonic strains)困难。抑制用的血清很难制作。抑制反应有时很不明显,例如有的用肉眼就能见到明显的抑制区;镜检时,在免疫血清浓度很高的区域,也能见到支原体菌落。

Goodwin等(1966)对代谢抑制试验的评价是,最高滴度为1/24,多数低于1/12,样本滴度明显与猪的免疫状态不符。“假阳性”样本经重复试验仍为阳性。又对其他支原体进行该试验(猪鼻支原体、人肺炎支原体、禽败毒支原体),也有滴度反应。经加热灭活可以减弱滴度反应,但是经常并不如此,不易分析得出结果。这可能在猪血清中有非特异性代谢抑制物质,甚至饲料也能影响代谢抑制。

生长抑制试验方法,最近介绍较多的是圆纸片抑制试验(方法见前)。

Goodwin等(1969)的代谢抑制试验是在有金属盖并经石蜡膜密封的2×1/2吋试管内进行的。用标准的液体培养基制备两组血清稀释液,每管加0.5毫升,同时加入用同样培养

基稀释的支原体培养物,使最终血清稀释度达到1/3、1/6、1/12等以及1/2、1/4、1/8等(两组均用倍进法)。每次试验都设培养基和微生物对照组,当微生物对照组的pH值比培养基对照组低0.5时,就可判定试验结果。所用的猪肺炎支原体菌种曾在固体培养基上连续进行5次单菌落移植;同时用不进行这样处理的抗原进行比较。血清样品经56°C30分钟灭活处理。在连续50次试验中,检查了各种血清样本(每种两份)。结果发现50%的样品滴度没有差异,30%差一个稀释度,16%不超过两个稀释度,总数达96%。这里一个稀释度与另一个稀释度之间,因采用两组倍进法,差异相对地较小。为了试验其重复性,用同一瓶液体培养,连续6天分别检查了1份血清、和连续3天分别用6批培养基6次重复试验,结果滴度最大差异一般为两个稀释度,仅有1次为3个稀释度。关于抗原浓度,经标准安瓿支原体稀释 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ 检查6份血清,比较结果后多采用 10^{-8} 的。

(2) 血凝和血凝抑制试验

不少种支原体具有吸附和凝集红血球的作用(血凝试验),如有特异性抗体存在,则凝集作用被抑制(血凝抑制试验)。血凝抑制试验是敏感而特异的。但到目前为止,除用于家禽支原体诊断外,尚未见用于其他支原体病的诊断。间接血凝(红血球用鞣酸处理),已用于牛(Cottew, 1960)、人(Tully, 1963)和猪支原体病的检查(Goodwin等, 1969; Lam等, 1970)。声振裂解的菌体或可溶性抗原(如丝状支原体的半乳聚糖),能吸附在用鞣酸处理过的血球的表面。这个方法改变了抗原粒子,该种抗原与特异抗血清相遇时,则形成可见的凝集。有人认为它比补体结合试验特异性更强;但由于绵羊红血球来源不同,虽为同样的血清其滴度也有很大差异(Taylor-Robinson和Ludwig, 1965)。Switzer(1972)认为,间接血凝试验能查出发病初期的抗体,滴度很高,但由于其对试剂和试验条件要求很高,因此,目前还难应用在一般诊断上。

Goodwin等(1969)制备兔血清(即1%蛋白质)方法是,用正常兔血清经56°C、30分钟灭活,后加等量经洗涤和聚集的绵羊红血球,在37°C吸收一小时,以pH=7.2磷酸缓冲液稀释即成为1:100正常兔血清。试验猪血清,亦按同法灭活和吸收。抗原制法是,当液体培养基培养物的pH由7.4降至6.9时,将培养物以53,700g离心30分钟,沉淀物用磷酸缓冲液洗涤两次,再悬浮成原来容积的1/100,保藏于低温中。此猪肺炎支原体的不透明度相当于4号布朗氏管。致敏红血球制法是,先将绵羊红血球以鞣酸处理。血球用pH7.2磷酸盐缓冲液洗3次,后按2.5%浓度悬浮于Alsever氏液中。再加入等量现配的pH为7.2的1/120,000鞣酸磷酸盐溶液,在4°C下置15分钟,离心,所得的血球再用pH=7.2的磷酸盐缓冲液洗两次,按原来的浓度悬浮于pH=6.4的磷酸盐缓冲液中。在此处理过的绵羊红血球中,再加入等量的适当稀释度的抗原(1/30, pH=6.4),置于37°C水浴15分钟,离心,沉淀物用1%蛋白质洗涤3次,并制成原容积悬液备用。

用12×75毫米pyrex试管作试验。以1%蛋白质0.5毫升对待检血清作倍进稀释,由1/5开始;每管加致敏红血球0.5毫升。剧烈摇动试管,在37°C培育2小时,记录结果。再次摇动试管,并在室温下放置过夜,作最后记录(把产生明显凝集的最高血清稀释度作为终点)。对未知血清检查时,应设下列对照组:(1)每份试验血清的前四个稀释度加未致敏的鞣酸处理红血球对照(2)致敏红血球加稀释液(抗原对照)对照(3)特异性兔抗血清为阳性对照(4)用本试验证明无抗体的阴性猪为阴性对照。经可重复性试验表明,同一份血清检样在几天中的滴度差异不超过一个倍进稀释度。

特异性的证实: 两组血清稀释液中, 一组每管加 0.05 毫升抗原, 另一组每管加 0.05 毫升 1% 蛋白质, 在 4°C 过夜。每管都加入致敏红血球 0.05 毫升。常规培养后, 观察血凝抑制情况。结果发现, 用猪肺炎支原体免疫的兔血清和高滴度的猪血清, 均被同种抗原所抑制, 但与按同法制备的猪鼻支原体抗原则不起反应。此外, 用经猪鼻支原体、B₃ 株支原体、粒状支原体和鸡败毒支原体抗原致敏的鞣酸处理过的红血球来滴定上述兔和猪血清, 均未产生显著滴定价。在少数几份血清中, 曾见 1/40 稀释度以下的非特异性反应。试验结果表明, 感染前猪血清滴度均低于 1/5 (1 例除外), 感染后 12 天 (1 例)、18 天 (2 例)、20 天 (8 例) 或 22 天 (1 例) 的猪血清, 尽管猪的肺部有地方性肺炎的实质病变, 可是血清滴度均低于 1/5。与此相反, 感染以后 18 周的猪血清, 阳性滴度有达 1:40,000 者。

Goodwin 等 (1970) 用上法检查了 14 例无法用代谢抑制试验来诊断的患地方性肺炎的病猪, 结果均为阳性。他们还用此法检查了病肺组织和邻近支气管淋巴结中的猪肺炎支原体抗体。在 5 份野外病例和 2 份实验室病例的病肺组织中, 检出了小于 1:4 到 1:40,960 的不同滴度的抗体。检查了 1 头实验接种猪支气管淋巴结中的抗体, 滴度为 1:80。为了排除交叉反应的干扰, Goodwin 等研究了猪鼻支原体、粒状支原体、B₃ 支原体、猪肺炎支原体美国株和英国株的 3 个品系, 包括 J 株的纯化和非纯化分离物之间的抗原关系。结果证明, 这几种主要支原体的抗原表现不同。间接血凝和补体结合试验证明, 猪肺炎支原体 (英国株) 的 3 个品系没有显著的抗原性差异。在兔血清中出现的抗培养基成分的抗体, 用正常猪血清或冻干液体培养基吸收可予去除; 但采用反复洗涤用兔血清的抗原的方法, 则无法除尽其中的培养基成分。在猪血清中不存在此问题。

Lam 和 Switzer (1971) 在间接血凝中改用猪血球代替羊血球, 并改良了抗原制法。将 50 毫升 3 日龄培养物接种于内有 500 毫升 Dulbecco 磷酸盐缓冲液的三角烧瓶中培养 5 天, 后经 12,000 转/分 (35,000g) 30 分钟离心, 沉淀用 pH=7.2 磷酸盐缓冲液洗两次, 并悬浮在 5.5 毫升去离子水中。加入适量的 2% 月桂酰硫酸钠 (Razin 等, 1965), 使最终浓度达到 0.2%。在 pH 为 8.0 的 5M 硫酸铵中透析过夜。经 600g 15 分钟离心后又在磷酸盐缓冲液中透析 72 小时。加入 1:10,000 噻汞撒, 储于 4°C。间接血凝操作在 U 形盘中进行。用加 2% 明胶的磷酸盐缓冲液为稀释液。每份包括 0.05 毫升稀释血清, 0.025 毫升致敏红血球, 混合, 37°C 1 小时后读数, 血球沉集凹底即为阳性。1:12 以上滴度判为阳性。试验结果在 62 只人工感染并有肺炎病变的猪中有 57 例为阳性 (92%); 9 只人工感染未见病变的猪中只有 3 例为阳性。自然病例相应检出率分别为 78.1% 和 68.2%。感染粒状支原体、猪鼻支原体的抗血清与猪肺炎支原体致敏的猪红血球之间无交叉反应。他们认为此法效果好, 可以推广。并认为由于猪血清中天然存在着对绵羊红血球的溶血素, 而后者具有热稳定性并很难被吸收除去。这种溶血作用掩盖了抗原-抗体反应。猪红血球反应滴度一般比绵羊红血球低一档倍进法滴度。但由于它不溶血, 前一缺点变为次要。月桂酰硫酸钠溶菌效果好, 支原体的云雾状在几分钟内即可澄清。经缓冲液几次洗涤, 月桂酰硫酸钠即可被洗去 (Engleman 等, 1968)。噻汞撒能防止污染, 为本系统抗原-抗体作用所必不可少。新鲜制备的抗原如不加噻汞撒, 就对抗血清不起作用; 加入 1:10,000 的浓度, 即能见到反应, 这有待于继续研究。以后, 他们又以间接血凝法来检查实验感染的猪。据说, 在感染后 2~3 周即可查出抗体, 8~11 周达高滴度, 持续在 28 周以上, 有的在 48 周仍能查出抗体。接触感染猪在 7~8 周即出现抗体, 13~14 周达高滴度, 持续在 28 周以上。另曾用接种过猪肺炎

支原体疫苗的猪的血清, 接种健康猪, 3 小时后即查出抗体, 故 Lam 和 Switzer (1972) 认为, 间接血凝试验已能做为实验室常规诊断手段。

(3) 补体结合试验

Boulanger 和 L'Ecuyer (1968) 用直接补体结合法检查猪地方性肺炎。他们把猪血清灭活, 并加入未加热的犊牛血清 (6 月龄犊牛, 加 1%), 以检查感染后补结滴度的升降 (14~267 天)。据认为, 这种方法为研究提供了一种特异的可靠的方法。他们还试用过 Rice (1954) 的间接补结法, 但效价低于上述直接法。高取等 (1968) 用类似方法检出了阳性猪, 滴度开始出现于感染后的第 2~3 周。Roberts (1968) 发现, 在人工感染后第 6 周, 猪血样滴度为 1:80。接种 J 株 8 周后, 产生典型病变, 血清补结滴度为 1:160。凡肺部有病变的试验猪, 滴度为 1:80 到 1:160。未加热的血清, 在 1:10 和 1:20 两稀释度常出现明显的溶血性前带现象。Hodges 和 Betts (1969) 用此法于人工感染猪中, 检出了抗猪肺炎支原体的不耐热的抗体, 滴度为 1:40 到 1:320 (在接种后 2 周出现, 持续时间至少 15 周)。猪血清中的助补性阻碍了检出 1:20 以下滴度的抗体。检查 93 份屠宰猪的血清, 在有可见病变的猪中 61% 为阳性, 无病变猪有 12% 为阳性。他们又采集 10 个病猪群 163 只病猪血样和 8 个健康猪群 159 只猪血样, 补结试验结果表明, 在病猪群的血样中, 有可见病变的猪 81% 为阳性, 无病变的有 69% 为阳性, 有可疑病变的 55% 为阳性。全部血清样本阳性率为 72%。6 个健康群 125 份血清中只有 4 例阳性。Goodwin 和 Hodgson (1970) 其后略加改进, 使用兔血清, 在 4°C 下结合三小时。所有兔血清均经用等量正常猪血清 (56°C 灭活 30 分钟) 处理过夜, 其后离心。

Wallis 和 Thompson (1969) 用不加热的血清试验了 24 群 289 头猪的血样。4 个无病猪群中的 47 份血样均为阴性; 20 个病猪群中, 滴度大于 1:40 的阳性病例为 3~83%。由于猪血清具有助补活性, 故放弃了小于 1:10 稀释度的。他们认为加热到 56°C 时, 能破坏血清补结活性。Boulanger 和 L'Ecuyer (1970) 认为, 新鲜猪血清具有助补和溶血活性 (1:10, 更多在 1:20 时), 这可干扰抗体的检出, 所以过去使用牛血清。也发现有些犊牛血清在有猪肺炎支原体存在时, 能产生非特异性结合补体, 故应事先检查犊牛以选出无非特异性反应者。6 周龄以下犊牛, 还不具有“附加因子”。这种因子随年龄而上升, 3 月龄以前不够用, 8~12 月龄始够用, 但此时它常产生非特异因子。他们认为 Wallis 等的失败, 是由于血清出了毛病。Eshildsen 等 (1971) 认为, 试验的各种材料如放置过久, 则未加热的猪血清的补体激活作用会使特异性的结合被掩盖。Switzer (1972) 在评述血清学诊断方法时, 认为补结试验是诊断猪地方性肺炎最好的方法。据他认为, 用猪血清进行补结试验存在的自然溶血素、助补活性 (Procomplementary activity) 和结合补体能力微弱等三个问题可用两个简单方法来解决: (1) 将试验血清在 56°C 灭活 15~30 分钟来破坏大部分溶血素 (2) 用正常无肺炎幼猪血清加入已干的豚鼠血清中, 以重新构成补体。这有双重意义, 一是在测定豚鼠血清滴度以前, 提供“助补活性”或强化豚鼠血清补体, 二是对抗原-抗体复合物提供了附加的补体结合活性。这一措施与改良的直接补结法加入新鲜犊牛血清大致具有相同意义。据认为, 微量直接补结法能检出 85% 以上有典型支原体肺炎的病猪。现已知补结反应查出的抗体能耐受 2-巯基乙醇处理, 也不被二乙基氨基乙酯所吸附。这说明此种抗体属于 7~9S 群。可查出的抗体通常在感染后第 3 周出现。

Boulanger 和 L'Ecuyer (1968) 将液体培养基分装于 500 毫升大瓶中。每瓶接种