

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1468—2007

丝状支原体山羊亚种检测方法

Methods for Detecting *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

世界动物卫生组织 [World Organization for Animal Health (英), Office International des Epizootic (法), OIE] 编写的《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(第五版, 2004) 中, 山羊接触传染性胸膜肺炎的病原为山羊支原体山羊肺炎亚种 (*Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, Mccp)。在本标准中, 山羊接触传染性胸膜肺炎的病原是丝状支原体山羊亚种 (PG₃)。虽然病原不同, 但其诊断技术标准同步。

本标准附录 A、附录 B、附录 D 和附录 I 均为资料性附录; 附录 C、附录 E、附录 F、附录 G 和附录 H 均为规范性附录。

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: 中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人: 逯忠新、储岳峰、赵萍、高鹏程。

丝状支原体山羊亚种检测方法

1 范围

本标准规定了丝状支原体山羊亚种病原学和血清学诊断方法要求。

本标准适用于由丝状支原体山羊亚种引起的山羊接触传染性胸膜肺炎的诊断。

2 病原学检查

2.1 材料准备

2.1.1 培养基

20%马血清马丁肉汤；20%马血清马丁琼脂；葡萄糖酵解培养基；精氨酸水解培养基；磷酸酶培养基（BPh）；凝固血清消化培养基（Sd）；菌膜、菌斑形成试验培养基。制备方法均参见附录 A（A.1~A.7）。

2.1.2 试剂

NET 缓冲液（参见附录 B.1）、TAE 电泳缓冲液（参见附录 B.2）；十二烷基硫酸钠（SDS）、RNase A、蛋白酶 K、酚—氯仿—异戊醇（25：24：1）、无水乙醇、Taq DNA 聚合酶、10×PCR buffer（含 Mg²⁺）、脱氧三磷酸核苷酸混合液（dNTPs）、ØX174-HaeIII digest DNA 分子质量标准、琼脂糖、溴化乙锭、灭菌双蒸水。

2.1.3 引物

Pc1 5'-TAT ATG GAG TAA AAA GAC-3'

Pc2 5'-AAT GCA TCA TAA ATA ATT G-3'

Pc3 5'-TTA ATA AGT GTG TAT ATG AAT-3'

Pc4 5'-ACT GAG CAA TTC CTC TT-3'

引物在使用时用灭菌双蒸水稀释为 25 μmol/L~50 μmol/L。

2.1.4 其他材料

2.1.4.1 兔抗支原体血清（ra-m）、健康兔血清（NRS），制备方法见附录 C。

2.1.4.2 抗兔免疫球蛋白荧光抗体（a-r Ig-FITC）。

2.1.4.3 灭菌器械（剪刀、镊子、吸管、青霉素瓶等）。

2.2 病料采集

2.2.1 活体病料采集：将棉拭子伸入待检山羊鼻腔内采集分泌物，放入无菌试管中立即送往实验室供分离。

2.2.2 剖检病料采集：采集肺病变部、特别是硬变部位和非硬变部位的交界处的样品以及胸水和纵隔淋巴结。

2.2.3 样品运送：采集的样品，应在 4℃ 条件下 24 h 内送到实验室。如果不能立即进行微生物学检查，可将样品或整个肺置 -20℃ 冷冻保存 1 个~2 个月。

2.3 病原分离

样品拭子悬浮于 2 mL~3 mL 20% 马血清马丁肉汤中。组织样品用剪刀剪碎，每 1 g 加 20% 马血清马丁肉汤 9 mL，强烈震荡；或在培养基内捣碎。胸水、组织悬液或拭子均需用 20% 马血清马丁肉汤做 3 个 10 倍系列稀释，稀释到 10⁻⁴。将样品的各稀释液分别接种于 20% 马血清马丁肉汤和琼脂培养基，培养皿用胶布封口，置 37℃ 培养 5 d~7 d，每天观察一次。如未见生长，可按上述方法连传 3