

3308 支原体检验法（标准草案）

1 培养基

1.1 培养基及配方 改良 Frey 氏液体培养基和改良 Frey 氏固体培养基用于禽源性支原体检验，支原体液体培养基和支原体固体培养基用于非禽源性支原体检验，无血清支原体培养基用于血清检验。

1.1.1 改良 Frey 氏液体培养基

氯化钠	5.0g
氯化钾	0.4g
硫酸镁（含 7 个结晶水）	0.2g
磷酸氢二钠（含 12 个结晶水）	1.6g
无水磷酸二氢钾	0.2g
葡萄糖（含 1 个结晶水）	10g
乳蛋白水解物	5.0g
酵母浸出粉	5.0g
（或 25%酵母浸出液）	（或 100ml）
1%辅酶 I	10ml
1% L-半胱氨酸溶液	10ml
2%精氨酸溶液	20ml
猪（或马）血清	100ml
1%酚红溶液	1.0ml
8 万单位/ml 青霉素	10ml
注射用水	加至 1000ml

将上述成分混合溶解，用 1.0mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 7.6~7.8，过滤除菌，定量分装，置-20℃以下保存。

1.1.2 改良 Frey 氏固体培养基

固体培养基基础成分

氯化钠	5.0g
氯化钾	0.4g
硫酸镁（含 7 个结晶水）	0.2g
磷酸氢二钠（含 12 个结晶水）	1.6g
无水磷酸二氢钾	0.2g
葡萄糖（含 1 个结晶水）	10.0g
乳蛋白水解物	5.0g
酵母浸出粉	5.0g
（或 25%酵母浸出液）	（或 100ml）
琼脂	15g

注射用水 加至 1000ml

上述成分混合后加热溶解,用 1.0mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 7.6~7.8,定量分装,116°C灭菌 20 分钟后,置 2~8°C保存。使用前将 100ml 固体培养基加热融化,当温度降到 60°C左右时,添加培养基辅助成份。

注:培养基辅助成分

猪(或马)血清	10ml
2%精氨酸溶液	2.0ml
1%辅酶 I 溶液	1.0ml
1%L-半胱氨酸溶液	1.0ml
8 万单位/ml 青霉素	1.0ml

上述成分混合后,过滤除菌,定量分装,置-20°C以下保存。

1.1.3 支原体液体培养基

PPLO 肉汤粉	21g
葡萄糖(含 1 个结晶水)	5.0g
10%精氨酸溶液	10ml
10 倍浓缩 MEM 培养液	10ml
酵母浸出粉	5.0g
(或 25%酵母浸出液)	(或 100ml)
8 万单位/ml 青霉素	10ml
猪(或马)血清	100ml
1%酚红溶液	1.0ml
注射用水	加至 1000ml

将上述成分混合溶解,用 1.0mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 7.6~7.8,过滤除菌,定量分装,置-20°C以下保存。

1.1.4 支原体固体培养基

固体培养基基础成分

PPLO 肉汤粉	21g
葡萄糖(含 1 个结晶水)	5.0g
酵母浸出粉	5.0g
(或 25%酵母浸出液)	(或 100ml)
琼脂	15g
注射用水	加至 1000ml

上述成分混合后加热溶解,用 1.0mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 7.6~7.8,定量分装,116°C灭菌 20 分钟后,置 2~8°C保存。使用前将 100ml 固体培养基加热融化,当温度降到 60°C左右时,添加培养基辅助成份。

注:培养基辅助成分

血清	10ml
----	------

10%精氨酸溶液	1.0ml
10 倍浓缩 MEM 培养液	1.0ml
8 万单位/ml 青霉素溶液	1.0ml

上述成分混合后，过滤除菌，定量分装，置-20℃以下保存。

1.1.5 无血清支原体培养基

PPLO 肉汤粉	21g
葡萄糖（含 1 个结晶水）	5.0g
10%精氨酸溶液	10ml
10 倍浓缩 MEM 培养液	10ml
酵母浸出粉	5.0g
（或 25%酵母浸出液）	（或 100ml）
8 万单位/ml 青霉素	10ml
1%酚红溶液	1.0ml
注射用水	加至 1000ml

将上述成分混合溶解，用 1.0mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 7.6~7.8，过滤除菌，定量分装，置-20℃以下保存。

1.2 培养基的质量控制

1.2.1 性状

1.2.1.1 改良 Frey 氏液体培养基 澄清、无杂质，呈玫瑰红色的液体。

1.2.1.2 改良 Frey 氏固体培养基 基础成分呈淡黄色，加热融化后无絮状物或沉淀。

1.2.1.3 支原体液体培养基 澄清、无杂质，呈玫瑰红色的液体。

1.2.1.4 支原体固体培养基 基础成分呈淡黄色，加热融化后无絮状物或沉淀。

1.2.1.5 无血清支原体培养基 澄清、无杂质，呈玫瑰红色的液体。

1.2.2 pH 值 改良 Frey 氏液体培养基、改良 Frey 氏固体培养基、支原体液体培养基、支原体固体培养基、无血清支原体培养基 pH 值均为 7.6~7.8。

1.2.3 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

1.2.4 灵敏度检查和微生物促生长试验

1.2.4.1 质控菌种及培养基

质控菌种	CVCC 菌种编号	培养基
滑液支原体 (<i>Mycoplasma synoviae</i>)	CVCC 2960	改良 Frey 氏液体培养基 改良 Frey 氏固体培养基 支原体液体培养基
猪鼻支原体 (<i>Mycoplasma hyorhinis</i>)	CVCC 361	支原体固体培养基 无血清支原体培养基

1.2.4.2 灵敏度检查 改良 Frey 氏液体培养基、支原体液体培养基、无血清支原体培养基采用灵敏度试验进行质量控制。将质控菌种标准品接种待检的液体培养基小管 2 支，同

时设 2 支未接种的液体培养基小管作为阴性对照，置 35~37°C 培养 5~7 日。质控菌株标准品接种管均变色，且阴性对照不变色时，判定该液体培养基灵敏度检查符合规定，其他情况判为不符合规定。

1.2.4.3 微生物促生长试验 改良 Frey 氏固体培养基和支原体固体培养基采用微生物促生长试验进行质量控制。将不大于 50CFU 质控菌种标准品接种 2 个待检的固体培养基平板，同时设 2 个未接种的固体培养基平板作为阴性对照，均置 35~37°C、含 5%CO₂ 的潮湿环境下培养 5~7 日。当接种的固体培养基平板上有支原体菌落生长且个数在 1~50 个之间，且阴性对照无菌落生长时，判定该固体培养基微生物促生长试验符合规定，其他情况判为不符合规定。

2 检查法

2.1 样品处理 每批制品（毒种、细胞）取样 5 瓶。液体制品混合后备用；冻干制品，则加液体培养基或无菌生理盐水复溶后混合；检测血清时，用血清直接接种。

2.2 疫苗与毒种的检测

2.2.1 接种与观察 每个样品需同时用以下两种方法检测。

2.2.1.1 液体培养基培养 将样品混合物 5.0ml 接种装有 20ml 液体培养基的小瓶，摇匀后，再从小瓶中取 0.4ml 移植到 2 支含有 1.8ml 培养基的小管（1.0cm×10cm），每支各接种 0.2ml，将小瓶与小管置 35~37°C 培养，分别于接种后 5 日、10 日、15 日从小瓶中取 0.4ml 培养物移植到 2 支含有 1.8ml 培养基的小管内，逐日观察培养物有无颜色变化（变黄或变红），若无变化，则在最后一次移植培养 14 日后停止观察。在观察期内，如果小瓶或任意一支液体培养基小管培养物出现明显颜色变化，应立即将小瓶中的培养物移植于液体培养基小管中，观察在液体培养基中是否出现恒定的颜色变化。

2.2.1.2 固体培养基培养 在每次液体培养物移植液体培养基小管培养的同时，取 0.1~0.2ml/培养物接种固体培养基平板，置 35~37°C、含 5%~10%CO₂ 的潮湿环境下培养。当液体培养基出现明显颜色变化时，需同时接种固体培养基平板。每 3~5 日，在低倍显微镜下观察各固体培养基平板上有无支原体菌落出现，观察 14 日，仍无菌落生长时，停止观察。

2.2.2 每次检查需同时设阴、阳性对照，液体培养基小管及固体培养基平板各 2 支（个），阳性对照接种量为不超过 50 个 CFU 的质控菌，阴性对照不接种，阳性对照、阴性对照、检测样品在同条件下培养观察。检测禽类疫苗时用滑液支原体作为阳性对照，检测其他疫苗时用猪鼻支原体作为阳性对照。

2.3 血清的检测 取被检血清 10ml 接种 90ml 的无血清支原体培养基，培养基按 2.2.1 项接种、移植、培养，观察液体培养基小管的颜色变化情况和固体培养基平板上有无菌落生长。

3 结果判定

3.1 接种样品的任何一个固体培养基平板上出现支原体菌落时，判不符合规定。

3.2 当阳性对照中所有固体培养基平板均出现支原体菌落，且阴性对照中无支原体生长时，检验有效。

修订说明：

1. 本标准系在 2020 年版《中国兽药典》三部附录 3308 基础上修订而成。
2. 在附录标准中删除了 1%的醋酸铊组分。醋酸铊有毒有害，作为防腐，属于管制化学药品，不易获得或管理。
3. 依据 2024 年第 2 次会议审查意见，删除了第一自然段内容，维持了 2020 年版《中国兽药典》三部附录 3308 中没有开头自然段的原状。
4. 在培养基质量控制中，对于 1.2.2 pH 值项下的重复描述，改为“改良 Frey 氏液体培养基、改良 Frey 氏固体培养基、支原体液体培养基、支原体固体培养基、无血清支原体培养基 pH 值均为 7.6~7.8。”，属于规范性修改。
5. 在检查法中，增加对复溶用生理盐水的“无菌”条件，改为“无菌生理盐水复溶后混合”。
6. 中监所细菌一室已制备了质控菌标准品，对 1.2.4.2 灵敏度检查和 1.2.4.3 微生物促生长试验的标准进行了规范表述。
7. 将培养基性状项下的各培养基后的“冒号”改为空格。属于规范性修改。
8. 依据 2024 年第 2 次会议审查意见，完善了标准品制定依据和修改理由。
9. 规范性修改：如 2.2.1 “观察 pH 值变化”改为“观察颜色变化”；“小管液体培养基”、“小管”统一改为“液体培养基小管”；“琼脂固体平板”“琼脂平板”统一为“固体培养基平板”；2.2.1.2 和 1.2.4.3 统一将培养条件改为“35~37℃、含 5%~10%CO₂ 的潮湿环境”。2.2.1.2 “琼脂固体平板培养”修改为“固体培养基培养”，与 2.2.1.1 液体培养基培养相对应。
10. 删除了 2.2.1.1 和 2.2.1.2 中“在原 pH 值变化范围达±0.5 时”的表述，原因是与前面颜色出现明显变化不符（出现明显变化应规定变化的最小 pH 而不是最大值），颜色变化不需要测定 pH 值即可判断。
11. 在 2.2 项中明确了阳性对照加入质控菌的量，因为加入对照的目的是保证检验的培养基灵敏度和微生物促生长试验符合要求，因此与培养基的质控保持一致。
12. 在 2.3 项中血清的检测不涉及稀释过程，将“稀释”改为“接种”。
13. 在 3.2 项中原来规定“阳性对照至少有 1 个平板出现菌落生长”改为“所有固体培养基平板均出现支原体菌落”，因为按照标准品的使用或者规范控制不超过 50CFU 的质控菌，其平板上应全部长出菌落。
14. 依据 2024 年第 12 次会议审查意见，删除了 1.2.4.1 项中表格所列的 ATCC17981 质控菌；将“质控菌参考品”修改为“质控菌标准品”。
15. 有关支原体相关研究报告（略）。