

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.3.02

# 一株牛支原体的分离鉴定及致病性初步研究

刘莹, 杨承槐, 陈小云, 王磊\*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2020-09-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 03-0006-05 [中图分类号] S852.62

**[摘要]** 对采集到的疑似牛支原体肺炎肺组织病料进行病原的分离, 并对分离株进行形态学、生化和分子生物学鉴定, 结果显示成功分离获得 1 株牛支原体, 命名为 NM001。该分离株的菌落形态呈典型的“荷包蛋状”, 不能发酵葡萄糖, 不能水解精氨酸, 不分解尿素。PCR 能够扩增出牛支原体特异的 P48 基因条带, 16S rRNA 基因序列与 Ningxia-1 序列同源性的 99.03%。将该分离株接种 2 头 6 月龄犊牛均出现明显的临床症状, 剖检后胸腔中少量淡黄色渗出液, 肺脏出现肉样实变。试验结果表明, 分离到的牛支原体 NM001 株对牛具有较强的致病性, 为牛支原体攻毒模型的建立奠定了基础。

**[关键词]** 牛支原体; 分离; 鉴定; 致病性

## Identification of a *Mycoplasma bovis* and the Initial Virulence Analysis in Cattle

LIU Ying, YANG Cheng-huai, CHEN Xiao-yun, WANG Lei\*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: WANG Lei, E-mail: sdsfdxwl@163.com

**Abstract:** The suspected lung tissue samples were collected to isolate and identify pathogens by both morphological, biochemical and molecular techniques. Results showed that one strain of *Mycoplasma bovis*, designated as NM001, with typical fried-egg shape grown on solid medium was successfully isolated. NM001 could not ferment glucose, not hydrolyze arginine, and not decompose urea. An expected gene fragment of P48 for *Mycoplasma bovis* was amplified by PCR. Sequence analysis of the 16S rRNA gene revealed that NM001 has an identity of 99.03% with Ningxia-1 strain. Then two 6-month-old calves were intratracheally injected to analyse the initial virulence of NM001. Both calves inoculated with NM001 showed obvious clinical symptoms and necropsy symptom with a small amount of yellow fluid in the pericardial cavity. Moreover, clarification parenchyma appeared in different part of lung. These data suggested that one *Mycoplasma bovis* strain NM001 was successfully isolated with strong virulence to cattle, which provides a good infection model for *Mycoplasma bovis* virulence research.

**Key words:** *Mycoplasma bovis*; isolation; identification; virulence

基金项目: 中国兽医药品监察所级课题(201809)

作者简介: 刘莹, 硕士, 从事兽用生物制品检验工作。

通讯作者: 王磊。E-mail: sdsfdxwl@163.com

牛支原体(*Mycoplasma bovis*)能引起牛的肺炎、关节炎、结膜炎以及乳腺炎等多种疾病,严重危害着养牛业的健康发展<sup>[1]</sup>。牛支原体由 Hale 等于 1961 年首次从美国的乳腺炎牛奶中分离到,随后在全世界大多数养牛国家和地区均有报道<sup>[2]</sup>。我国自 2008 年分离到牛支原体并证实了我国存在牛支原体肺炎疫情以来<sup>[3]</sup>,全国多个地区均有报道,已给我国的养牛业造成了重大的经济损失<sup>[3-4]</sup>。

由于牛支原体没有细胞壁,其对常规的抗菌药物青霉素不敏感,且对其它的抗菌药物易产生耐药性<sup>[5]</sup>。因此,疫苗免疫成为预防牛支原体病的重要方向。然而,目前还没有商品化的牛支原体疫苗,这主要与牛支原体的致病机制和免疫机制不清楚、缺少疫苗评价动物模型等有关。为此,本研究从疑似牛支原体感染的牛肺组织中分离并鉴定出一株牛支原体,并分析了该分离株对牛的致病性。

## 1 材料与方 法

1.1 病料 采集内蒙某牛场患严重肺炎的病死牛病变肺脏组织 2 份。病牛表现精神沉郁,采食量下降,膝关节肿大,流鼻涕,呼吸困难,消瘦等。

1.2 主要试剂 支原体基因组提取试剂盒、premix Taq version 2.0、DNA Marker 购自 Takara 公司;马血清购自 Gibco 公司;支原体生化鉴定管购自青岛海博生物;支原体 EZH 液体培养基、支原体 EZH 固体培养基由本实验室配制;牛支原体抗体 ELISA 检测试剂盒购自 Biovet 公司。

1.3 引物合成 根据已有的研究报道<sup>[6]</sup>,设计合成牛支原体特异性引物对(P48 - F/ P48 - R)和牛支原体 16S rRNA 引物对(SF/SR)。引物序列如下:P48 - F: 5' - CGAACCTAAAAAGGGTGAATT-AGCATCTT - 3'; P48 - R: 5' - ATTACTGAGTTA-ATAGCAGCAACTGCAACG - 3'; SF: 5' - CCTTAG-GCAGTTTCTTTATAA - 3'; SR: 5 - CATGCAT-GTCGAGCGATGAT - 3'。引物由北京三博远志生物技术有限公司合成。

1.4 牛支原体的分离培养 无菌条件下将采集的肺组织切成小块,取约 1 g 肺组织加入 2 mL 含双抗的 PBS,研磨后 1000 r/min 离心 5 min,上清用 0.45 μm 滤膜过滤,加入支原体 EZH 液体培养基

中,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每隔 48 h 进行一次传代,取培养基颜色变黄且不浑浊者传至 3 代后,取 100 μL 涂布支原体 EZH 固体培养基表面,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。3 ~ 5 d 后,肉眼观察菌落生长情况并在显微镜下观察菌落形态,挑取单个克隆接种液体培养基,待生长后再接种固体培养基,进行至少 3 次克隆纯化获得纯培养物。

1.5 生化实验鉴定 使用生化鉴定管进行发酵葡萄糖试验、水解精氨酸试验以及分解尿素试验。

1.6 分子生物学鉴定 将 1.4 中克隆纯化后的疑似支原体菌落接种支原体液体培养基,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 3 d 后,培养基由红色变为黄色,吸取牛支原体培养菌液 2 mL,8000 r/min 离心 10 min,弃上清,收集菌体,用支原体基因提取试剂盒提取 DNA,然后取基因组 DNA 2 μL 作为模板加到如下反应体系中(50 μL):10 × PCR Buffer 5 μL, dNTP(2.5 μmol/L)4 μL,上游引物 2 μL,下游引物 2 μL,Taq 酶 1 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 至 50 μL。反应条件如下:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 1 min,57 退火 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 凝胶电泳检测,其中,选用 P48 - F/P48 - R 和 SF/SR 两套引物分别扩增,将 SF/SR 扩增产物进行基因测序后,在 NCBI 中进行比对。

1.7 致病性试验 选用牛支原体抗体阴性的 6 月龄犊牛 4 头,随机平均分为感染组和对照组 2 个组,每组 2 头牛。感染组每头牛经气管注射牛支原体培养液 6 mL(支原体浓度为 10<sup>9</sup> CFU/mL)。对照组注射等量培养基。连续观察 21 d,记录每组牛的临床症状,如有牛死亡则立即进行剖检并采集病料。攻毒 21 d 后,剖杀所有试验牛,剖检观察大体病理变化和肺部组织病理变化,采集病料并进行支原体分离鉴定。

## 2 结果与分析

2.1 病原的分离 2 份病料组织中,001 样品在接种液体培养基 3 d 后开始变黄且透亮,将液体培养基接种到固体培养基 3 d 后,出现针尖大小的菌落,普通光学显微镜下菌落均呈“荷包蛋状”

(图 1),圆形,中央部分较厚,有中心脐。将该纯培养物标记为牛支原体 MN001。

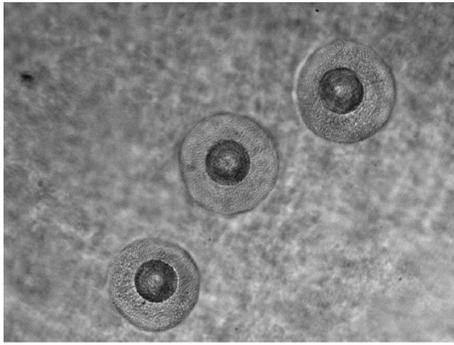
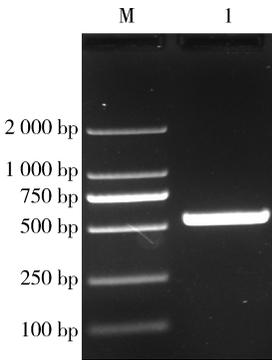


图 1 分离株的菌落形态(200 ×)

Fig 1 The colony of isolates(200 ×)

2.2 生化试验结果 生化管实验的结果显示,牛支原体分离株 NM001 不能发酵葡萄糖,不能水解精氨酸,不分解尿素。与已报道牛支原体生化特性相符。

2.3 支原体分离株 PCR 检测结果与序列分析 如图 2 所示,利用牛支原体特异性引物对 P48 - F/P48 - R 扩增出牛支原体 P48 基因片段大小约为 543 bp,与预期片段大小相符。



M: DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1: 牛支原体 NM001 株

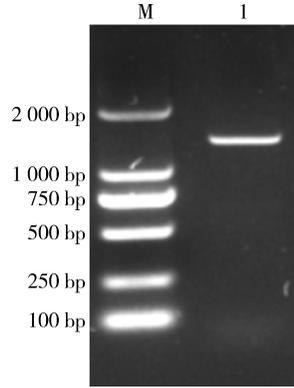
M: DL2000 DNA Marker; 1: *Mycoplasma bovis* NM001 strain

图 2 牛支原体 NM001 株 P48 基因的扩增结果

Fig 2 Amplification of P48 gene of

*Mycoplasma bovis* NM001 strain

利用引物对 SF/SR 成功扩增出大小约 1390 bp 的单一目的条带(图 3),与预期片段大小相符。测序结果表明,该片段为牛支原体的 16S rRNA 基因序列,与牛支原体 Ningxia - 1 株(GenBank: CP023663.1)的相似性为 99.03%。



M: DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1: 牛支原体 NM001 株

M: DL2000 DNA Marker; 1: *Mycoplasma bovis* NM001 strain

图 3 牛支原体 NM001 株 16S rRNA 基因的扩增结果

Fig 3 Amplification of 16S rRNA gene of

*Mycoplasma bovis* NM001 strain

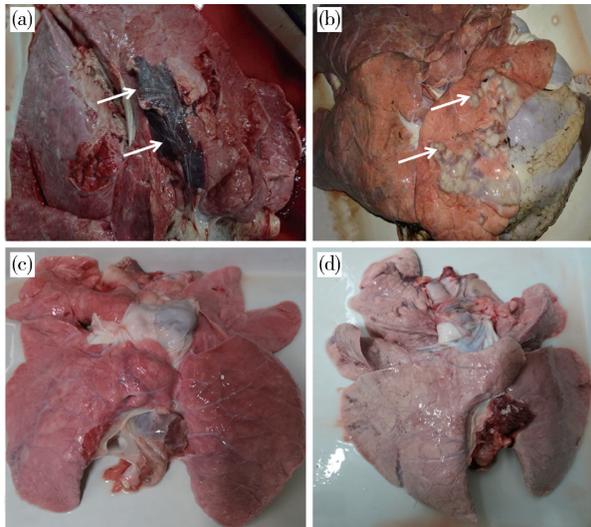
2.4 牛支原体 NM001 株对牛的致病性试验结果在攻毒后 21 d 的观察期内,感染组 2 头牛分别在攻毒后第 2 天和第 3 天出现体温上升(0.5 ~ 0.8 ℃),并分别维持 2 d 和 3 d 后下降至正常水平,对照组 2 头牛体温无明显变化。从第 7 天开始,感染组 1 头牛出现轻微咳嗽、呼吸急促、喘气等症状,从第 10 天开始,感染组两头牛均流出浆液性鼻液。对照组两头牛均无上述临床症状。

攻毒后 21 d 剖检,可见感染组胸腔中少量淡黄色渗出液,肺脏局部形成肝变区,颜色由红至灰黑色。其中感染组 1 号牛可见肺部形成肉样实变,并明显回缩(图 4a);2 号牛可见肺部颜色变为灰黑色,触感变硬(图 4b)。对照组 2 头牛肺脏均外观正常。

对照组的肺组织病料均未分离到支原体,感染组的肺组织病料中均分离到牛支原体,菌落形态、生化试验、PCR 鉴定结果与接种株一致。

### 3 讨论与结论

牛支原体(*M. bovis*)是一种基因组较小(约为 1030 kb)、无细胞壁的微生物。目前,除了最常见的牛支原体外,能感染牛的支原体还有多达 10 余种<sup>[7]</sup>。其中,无乳支原体与 *M. bovis* 能出现交叉免疫反应,且生化特性较为相似。为此,需要使用分子生物学诊断技术来准确区分二者<sup>[8]</sup>。本实验利用支原体 EZH 液体培养基、支原体 EZH 固体培养基,采用形态学观察、生化试验鉴定以及分子生物



a, b: 攻毒组; c, d: 对照组

a, b: cattles inoculated with *Mycoplasma bovis*; c, d: control

图 4 牛支原体 NM001 株感染牛肺脏的大体病变

Fig 4 Gross lung lesions of cattles inoculated with *Mycoplasma bovis* NM001 strain

学方法,最终确定从内蒙地区养殖场的牛病变肺脏组织中分离到的菌株为牛支原体。

虽然 16S rRNA 基因在细菌分类学上具有重要意义,但由于 *M. bovis* 与无乳支原体的 16S rRNA 基因的同源性很高,导致无法通过该基因来区分以上两种支原体<sup>[8]</sup>。为此,我们首先对分离株进行 *M. bovis* 的一种特异性的、相对保守的表面脂蛋白抗原(P48 蛋白)<sup>[8]</sup>的编码基因进行扩增,出现目的条带后再对分离株的 16S rRNA 基因进行扩增和测序,最终利用 16S rRNA 基因序列在 NCBI 中进行比对,结果显示 NM001 株与中国宁夏分离株 Ningxia-1 同源性最高,属于国内流行株。

牛支原体能够在牛体持续存在且具有条件性致病的特点<sup>[9]</sup>,这使某区域一旦出现牛支原体感染就很难清除,并且牛支原体会在一定区域内广泛流行。对于牛支原体病没有特效药,防治该病还应依靠疫苗接种。但是,自 1961 年第一株牛支原体被成功分离到现在,还没有可广泛使用的疫苗。目前,牛支原体疫苗的研究主要分为亚单位疫苗、灭活疫苗以及弱毒疫苗三类<sup>[10]</sup>。其中,亚单位疫苗的研究主要集中于可变表面蛋白(Vsps)以及

GAPDH(GapC)蛋白,但目前还未找到免疫保护性理想的蛋白;对于牛支原体灭活疫苗的研究较多,有研究者利用一种安全性良好的牛支原体灭活疫苗免疫牛,采用强毒力的牛支原体攻毒后,接种疫苗的犍牛几乎没有呼吸道症状,而所有未接种疫苗的犍牛都出现了肺炎的症状。与接种疫苗的犍牛相比,未接种疫苗的犍牛不仅体温明显升高,体重显著下降,而且出现明显肺部病变<sup>[11-12]</sup>。然而,也有研究者发现牛支原体灭活疫苗的接种虽然能够使犍牛产生很高水平的抗体,但仍无法预防牛支原体引起的关节炎<sup>[13]</sup>。此外,牛支原体灭活疫苗也无法预防牛支原体引起的乳腺炎,甚至疫苗的接种使乳腺炎症状更加严重<sup>[14]</sup>;在牛支原体弱毒疫苗的研究方面,我国的研究水平领先于世界。Zhang 等<sup>[15]</sup>研究发现,将我国牛支原体 HB0101 株在体外 41 °C 的条件下传到 150 代(P150)作为疫苗免疫牛,能够对牛起到很好的免疫保护。此外,在我国还可在一定程度上利用猪肺炎支原体的减毒活疫苗来预防牛支原体病<sup>[16]</sup>,但这种方法在世界其它地区还未被接受。综上所述,牛支原体疫苗的成功研制还需要更多的努力。

在牛支原体具体的致病机制和免疫逃逸机制还未得到完全阐明的现状下,牛支原体疫苗的成功研制离不开具体毒株的分离鉴定以及相关攻毒模型的建立。目前,牛支原体已经广泛分布于我国各地区,且牛支原体的成功分离报道已很常见,但相关的毒力验证,特别是牛体的毒力验证则极少。由于牛支原体是一种条件致病菌,且常与其它病原混合感染,如不进行支原体分离株的毒力验证,则无法确定其在相关疾病中是否是主要病因,也无法为牛支原体疫苗的研制提供有效的数据。为此,本研究在通过形态学观察、生化和分子生物学鉴定确定后,又将该牛支原体分离株接种犍牛,结果表明该分离株对犍牛具有较强的毒力。在考虑到动物应激反应以及操作工作量后,本研究在采用与张瑞<sup>[17]</sup>等报道相同的攻毒剂量和攻毒途径的基础上只进行了一次攻毒,就引起了犍牛明显的临床症状和病理变化,从而为牛支原体的毒力研究和攻毒模型的建立提供了重要的数据支持和生物材料。

## 参考文献:

- [1] Nicholas R A J, Ayling R D. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control [J]. Research in Veterinary Science, 2003, 74(2): 105–112.
- [2] Parker A M, Sheehy P A, Hazelton M S, et al. A review of mycoplasma diagnostics in cattle [J]. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2018, 32(3): 1241–1252.
- [3] 辛九庆, 李媛, 郭丹, 等. 国内首次从患肺炎的犊牛肺脏中分离到牛支原体[J]. 中国预防兽医学报, 2008(9): 661–664. Xin J Q, Li Y, Guo D, et al. First isolation of *Mycoplasma bovis* from calf lung with pneumoniae in China [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2008(9): 661–664.
- [4] 张建华, 曹希亮, 刘超, 等. 我国奶牛牛支原体流行情况调查[J]. 中国奶牛, 2017(3): 23–26. Zhang J H, Cao X L, Liu C, et al. Prevalence Investigation of *Mycoplasma bovis* in China [J]. China Dairy Cattle, 2017(3): 23–26.
- [5] Lysnyansky I, Ayling R D. *Mycoplasma bovis*: Mechanisms of resistance and trends in antimicrobial susceptibility [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 595.
- [6] 包世俊, 胡国明, 邢小勇, 等. 用于牛支原体检测的特异性引物对、检测试剂盒及其使用方法和应用: 中国, CN104946753A [P]. 2015–09–30. Bao S J, Hu G M, Xing X Y, et al. The specific primer pair, detection kit for detection of *Mycoplasma bovis* and its method and application; China, CN104946753A [P]. 2015–09–30.
- [7] 马海彬. 牛支原体的分离鉴定及检测方法的建立与应用 [D]. 军事科学院, 2018. Ma H B. Isolation and identification of *Mycoplasma bovis* and rapid development diagnosis methods [D]. Academy of Military Sciences PLA China, 2018.
- [8] 张锐. 牛支原体新疆分离株 P48 基因检测及抗原性研究 [D]. 石河子大学, 2015. Zhang R. Study on P48 gene and antigenicity of *Mycoplasma bovis* isolated in Xinjiang province [D]. Shihezi University, 2015.
- [9] Bürki S, Frey J, Pilo P. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis* [J]. Veterinary Microbiology, 2015, 179(1/2): 15–22.
- [10] Perez-Casal J, Prysliak T, Maina T, et al. Status of the development of a vaccine against *Mycoplasma bovis* [J]. Vaccine, 2017, 35(22): 2902–2907.
- [11] Dudek K, Bednarek D, Ayling R D, et al. An experimental vaccine composed of two adjuvants gives protection against *Mycoplasma bovis* in calves [J]. Vaccine, 2016, 34: 3051–3058.
- [12] Nicholas R A, Ayling R D, Stipkovits L P. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: clinical, cultural, serological and pathological findings [J]. Vaccine, 2002, 20: 3569–3575.
- [13] Nicholas R, Ayling R, Woodger N, et al. *Mycoplasmas* in adult cattle: bugs worth bothering about? [J]. Irish Veterinary Journal, 2006, 59: 568–572.
- [14] Calloway C D, Schultz L G, Chigerwe M, et al. Determination of serological and colostral response in late-gestation cows vaccinated with a *Mycoplasma bovis* bacterin [J]. American Journal of Veterinary Research, 2008, 69: 912–915.
- [15] Zhang R, Han X, Chen Y, et al. Attenuated *Mycoplasma bovis* strains provide protection against virulent infection in calves [J]. Vaccine, 2014, 32(25): 3107–3114.
- [16] Feng Z X, Wei Y N, Li G L, et al. Development and validation of an attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* aerosol vaccine [J]. Veterinary Microbiology, 2013, 167(3/4): 417–424.
- [17] 张瑞, 崔朋, 巴晓亮, 等. 牛支原体临床分离株牛体毒力和免疫原性比较[J]. 动物医学进展, 2013(6): 126–132. Zhang R, Cui P, Ba X L, et al. Comparison of virulence and immunogenicity of *Mycoplasma bovis* in beef cattle [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2013(6): 126–132.

(编辑:李文平)