

西藏牦牛牛支原体的分离鉴定及其生长特性、耐药性分析

王冬经^{1,2} 徐业芬^{1,2} 索朗斯珠^{1,2} 严明帅^{1,2} 赵霞玲^{1,2} 朱勇³ 牛家强^{1,2*}

(1. 西藏农牧学院 动物科学学院,西藏 林芝 860000;

2. 西藏农牧学院 西藏高原动物疫病研究自治区高校重点实验室,西藏 林芝 860000;

3. 西藏农牧科学院 畜牧兽医研究所,拉萨 850000)

摘要 为确定引起西藏牦牛常发多发肺炎的细菌病原体,采集145份西藏牦牛鼻腔粘液,通过病原分离培养、菌落形态观察、生化试验和PCR鉴定等方法进行细菌检测;通过OD₆₃₀和pH变化对分离株进行生长曲线测定;采用K-B纸片法进行药物敏感性试验。结果显示:从145份牦牛鼻腔粘液中分离得到10株牛支原体;分离株菌落形态和生化试验结果均符合牛支原体的生物学特性;通过PCR分别扩增得到238 bp的uvrC特异性基因与1 500 bp 16S rRNA基因。10株分离株间的uvrC特异性基因和16S rRNA基因序列同源性较高,均与国际标准株PG45有高度同源性,uvrC特异性基因序列和16S rRNA基因序列与国际标准株PG45的同源性分别为98.4%~100%和99.1%~99.9%。生长曲线测定表明,分离株在PPLO培养基中培养24 h内为迟缓期,培养42 h后开始进入稳定期,78 h后开始进入衰亡期;3个分离株培养物的平均pH随着培养时间延长不断降低,其中24~42 h期间pH下降最快,随后下降速度减慢,至78 h后几乎不再变化。药物敏感性试验表明,分离株对大环内酯类、氨基糖苷类和林可胺类药物均存在不同程度的耐药,但对强力霉素和卡那霉素敏感或中度敏感。

关键词 西藏牦牛;牛支原体;分离鉴定;生长曲线;耐药性

中图分类号 S852.62

文章编号 1007-4333(2020)12-0067-09

文献标志码 A

Isolation, identification, growth characteristics and drug resistance analysis of *Mycoplasma bovis* from Tibetan yak

WANG Dongjing^{1,2}, XU Yefen^{1,2}, SUO Langsizhu^{1,2}, YAN Mingshuai^{1,2},

ZHAO Xialing^{1,2}, ZHU Yong³, NIU Jiaqiang^{1,2*}

(1. Animal Science College, Tibet Agriculture & Animal Husbandry University, Nyingchi 860000, China;

2. Provincial Key Laboratory of Tibet Plateau Animal Epidemic Disease Research, Nyingchi 860000, China;

3. Animal husbandry and Veterinary Research Institute, Tibetan Academy of Agricultural Sciences, Lhasa 850000, China)

Abstract In order to clarify the bacterial pathogens causing frequent pneumonia in Tibetan yak, 145 nasal mucus of Tibetan yak were collected. Bacteriological determination was carried out through pathogen isolation and culture, colony morphology observation, biochemical test, and PCR detection. The growth curve of the isolate strain was determined by the change of optical density OD₆₃₀ and pH, and K-B disk method was used for antimicrobial susceptibility test. The results showed that ten strains of *Mycoplasma bovis* in total were isolated from 145 yak nasal mucus; The results of colony morphology and biochemical test were consistent with the biological characters of *Mycoplasma bovis*. One 238 bp target fragment corresponding to the uvrC specific gene and one 1 500 bp target fragment corresponding to the 16S rRNA gene were amplified by PCR. The nucleotide sequences of uvrC specific gene

收稿日期: 2019-12-06

基金项目: 国家肉牛牦牛产业体系(CARS-37);西藏特色家畜选育与健康养殖专项(XZ201801 NA03);厅校联合基金(XZ2018ZRG-15);西藏农牧学院研究生创新计划(YJS2018-07)

第一作者: 王冬经,硕士研究生,E-mail:920535395@qq.com

通讯作者: 牛家强,副教授,主要从事高原动物传染病研究,E-mail:463036297@qq.com

and 16S rRNA gene among the 10 isolates were highly homologous, and the homology between *uvrC* specific gene and the international standard strain PG45 was 98.4% – 100% and the homology between 16S rRNA gene and PG45 was 99.1% – 99.9%. The growth curve assay showed that the isolates cultured in PPLO medium were in lag phase for 24 h, entered stable period in 42 hours, and entered decline phase 78 hours later. In addition, the pH of the three isolates decreased with the prolongation of the culture time. The pH decreased the most rapidly during the period of 24 – 42 h, then decreased slowly and almost stayed unchanged after 78 h. The antimicrobial susceptibility analysis showed that the isolates were resistant to macrolides, aminoglycosides and lincomycin at various degrees, but they were sensitive or moderately sensitive to doxycycline and kanamycin.

Keywords Tibetan yak; *Mycoplasma bovis*; isolation and identification; growth curve; antimicrobial susceptibility

牦牛(Yak)是一个古老的物种,因其能够适应高海拔、低含氧量、低气压、昼夜温差大和牧草匮乏等其他牛种难以适应的高寒草地生态环境而得以延续至今,是我国高原地区珍贵的优势畜种资源,也是一个宝贵的遗传基因库^[1]。牦牛可提供肉、乳、毛等畜产品,也可使役,其粪便是当地重要的燃料来源,是青藏高原地区不可或缺的重要畜种^[2]。我国约有牦牛 1 500 余万头,主要分布于青海、西藏、甘肃、四川、云南和新疆,其中西藏牦牛约占全国总数的三分之一^[3],在农牧业生产中占有极其重要的地位。特殊的高原环境容易导致牦牛患呼吸道疾病,其中巴氏杆菌(*Pasteurellosis*)和牛支原体(*Mycoplasma bovis*)引发的感染较为多见。

牛支原体是牛呼吸道疾病综合征(BRDC)病原之一^[4],可引起牛肺炎、乳腺炎、关节炎、角膜结膜炎等^[5]。早在 1961 年, Hale 等^[6]首次从患有乳腺炎病牛乳汁中分离到了该病原体。黎济申等^[7] 1983 年首次从乳房炎病牛乳汁中分离到了牛支原体。石磊等^[8] 2008 年首次报道了湖北省由牛支原体引起的以肺组织肉变、坏死为主要特征的肉牛呼吸道传染病,并命名为“传染性牛支原体肺炎”。自此之后,牛支原体相关疾病先后在重庆、宁夏等地相继报道^[9-10],该病的广泛传播与迅速蔓延给我国养牛业造成了巨大的经济损失。

牛支原体病的实验室诊断主要有血清学、病原学、分子生物学方法^[11]。流行病学调查及初步诊断常采用血清学方法,但进一步确诊需采用病原分离和分子生物学的方法。目前,ELISA 法是血清学方法中最常用的方法之一,被广泛应用于牛支原体感染的流行病学调查,但不同检测试剂盒的特异性和准确性存在一定差异^[11];病原分离培养法虽然难度较大,周期较长,但其结果直观可靠、简明直接,是确诊该病最可靠的方法之一^[12]。分离中常采用生理生化鉴定和分子生物学鉴定等方法辅助诊断,其中

分子生物学方法可准确、快速地对培养物进行鉴定。由于牛支原体与无乳支原体 16S rRNA 基因高度相似,两者难以区分,因此需采用牛支原体高度保守基因进行鉴别诊断,目前使用较多的诊断基因主要有 *uvrC*、*OPPD/F* 等^[13-14]。

2012 年李坤等^[15]通过酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测发现,西藏多地牦牛感染牛支原体,其中以日喀则、昌都、拉萨等地牦牛牛支原体感染最为严重。2017 年以来,西藏多地牦牛出现以食欲下降、消瘦、呼吸急促、发热、咳嗽为其特征的疫病,经抗生素治疗,效果不佳,常转化为慢性呼吸道病,疑似牛支原体感染。鉴于此,本团队于 2019 年采集西藏部分地区有呼吸道症状的牦牛鼻拭子进行牛支原体的分离鉴定,在病原分离纯化的基础上,合成 16S rRNA 基因引物及 *uvrC* 特异性基因引物对分离株进行分子鉴定,并对牛支原体牦牛分离株生长特性及体外药物敏感性进行了分析,旨在从病原角度证实牛支原体在牦牛中的流行,并对当前流行株进行初步研究,为今后牦牛牛支原体病的防控提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 病料来源

通过鼻拭子采集具有咳嗽、喘息、呼吸急促、鼻液较多等呼吸道症状的西藏牦牛鼻腔粘液 145 份,分别置于装有少量 PPLO 液体培养基(内含青霉素,可抑制杂菌)的离心管中,快速运送至实验室并进行病原分离培养或冷藏处理。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂

PPLO broth、PPLO agar、Yeast Extract、Agar (BD 公司,美国);Sodium pyruvate(Sigma 公司,中国);苯酚红(国药集团化学试剂有限公司,中国);NaCl、NaOH、冰醋酸、无水乙醇(天津市致远化学试

剂有限公司,中国);马血清(Hyclone公司,美国);青霉素钠(山东圣旺药业股份有限公司,中国);2xTaq PCR MasterMix、Marker DL2 000、核酸染料(天根生化科技有限公司,中国);MEM(GIBCO公司,美国);Tris、Agarose M(BBI LIFE SCIENCES公司,中国);EDTA(SANGON BIOTECH公司,中国);生化鉴定管、K-B药敏纸片(杭州微生物试剂有限公司,中国)。PPLO固体培养基和PPLO液体培养基参照文献[8]方法制备,置于4℃冰箱,保存备用。

1.2.2 主要仪器

纯水仪(ELIX10);ABI PCR仪(Power pac);离心机(1730R);CO₂恒温培养箱(GNP-9050);电泳仪(Powerpac);凝胶成像仪(G;BOX);微量移液器(Eppendorf);电子天平(JA2103 N);酶标仪(RT-6100);pH计(PHS-3C)均来自西藏高原动物疫病研究自治区高校重点实验室。

1.3 病原的分离与纯化

病原分离与纯化参照师燕霞等^[13]的方法并进行适当调整,具体方法为:向装有鼻拭子的离心管中分别加入6 mL PPLO液体培养基,充分震荡混匀后,2 000 r/min离心6 min,取上清液,用0.45 μm滤器过滤得到约5 mL液体,置于37℃,5% CO₂恒温培养箱培养3~4 d,培养液由红变黄后,按照1:10的比例传代培养至3~4代后,涂布于PPLO固体培养基,培养4~5 d,挑取单个菌落接种于PPLO液体培养基。如此“固-液”交替进行培养物的纯化。

1.4 生化鉴定

分别按照各生化鉴定管使用说明书进行。

1.5 DNA提取

采用煮沸法提取牛支原体基因组DNA^[16]。

1.6 引物设计与合成

参照文献设计牛支原体 *uvrC* 特异性基因引物^[17]与16S rRNA基因引物^[18],并由天一辉远生物有限公司合成。

1.7 PCR扩增与测序

参照白智迪^[17]的反应体系及反应条件进行 *uvrC* 特异性基因的PCR扩增;参照郭亚男等^[18]的反应体系及反应条件进行16S rRNA基因的PCR扩增。

将上述PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,并通过凝胶成像系统观察结果。PCR产物经初步鉴

定后送至生工生物工程有限公司进行测序。

1.8 序列分析

采用DNA Star软件将分离株 *uvrC* 特异性基因序列、16S rRNA基因序列分别与不同参考株进行比对,并采用MAGA 7.0软件分别进行系统进化树构建。参考株信息如表1所示。

1.9 生长曲线的测定

随机选取3株牛支原体分离株,按照1:10的比例接种至PPLO液体培养基,置于37℃恒温培养3~4代使之生长稳定,作为待测液。将待测液按照1:10的比例接种,每个菌株设置3个重复,从培养0 h开始,每隔6 h测定1次OD₆₃₀及其pH,至126 h结束。以菌液培养时间为横坐标,以平均OD₆₃₀、pH为纵坐标,绘制相应菌株的生长曲线。

1.10 药敏试验

本次选用14种药敏纸片进行耐药性试验,分别为强力霉素、四环素、阿奇霉素、红霉素、氟苯尼考、新霉素、链霉素、大观霉素、庆大霉素、卡那霉素、林可霉素、环丙沙星、恩诺沙星和氧氟沙星。药敏试验操作步骤及判定标准严格按照说明书及CLSI判定标准进行^[19],菌液接种平板之后,均匀贴上药敏纸片。直径为150 mm的平板贴12张药敏纸片,直径90 mm的平板贴6张药敏纸片。置于37℃培养7 d,测定抑菌圈大小。

2 结果与分析

2.1 病原分离与菌落形态观察

145份鼻腔粘液样品中,10份得到了纯培养物。纯培养物经PPLO固体培养基培养后,在低倍镜下观察到“煎蛋状”菌落形态(图1),初步确定为牛支原体,并分别命名为Tibet-1、Tibet-2、Tibet-3、Tibet-4、Tibet-5、Tibet-6、Tibet-7、Tibet-8、Tibet-9和Tibet-10。

2.2 生化鉴定

生化鉴定结果显示:10株分离株均不发酵葡萄糖和乳糖,不水解明胶和精氨酸,不分解尿素和甘露醇,且胆固醇试验为阳性。

2.3 PCR检测

以10株分离株的DNA为模板,进行PCR扩增,并通过1%琼脂糖凝胶电泳确认。结果表明, *uvrC* 特异性基因引物和16S rRNA引物经PCR扩增分别得到238 bp(图2(a))和1 500 bp(图2(b))的片段,与预期结果相符。

表1 *uvrC* 特异性基因和 16S rRNA 基因序列参考株信息表Table 1 Information on reference strains of *uvrC* specific and 16S rRNA gene sequences

支原体种类 Mycoplasma species	名称 Name	<i>uvrC</i> 登录号 Accession number of <i>uvrC</i>	16S rRNA 登录号 Accession number of 16S rRNA	宿主 Host	来源 Source
牛支原体	08M	CP019639.1	CP019639.1	牛	中国甘肃
	16M	CP038861.1	CP038861.1	牛	中国山东
	CQ-W70	CP005933.1	CP005933.1	牛	中国重庆
	FJ-HJ		KX230478.1	牛	中国福建
	HB0801	CP002058.1	CP002058.1	牛	中国湖北
	Hubei-1	CP002513.1	CP002513.1	牛	中国湖北
	Ningxia-1	CP023663.1	CP023663.1	牛	中国宁夏
	NM2012	CP011348.1	CP011348.1	牛	中国内蒙古
	KG4397	AP019558.1	AP019558.1	牛	日本
	MYC2		KX462396.1	牛	匈牙利
	MYC22		KX462353.1	牛	匈牙利
	JF4278	LT578453.1	LT578453.1	牛	瑞士
	PG45	CP002188.1	NR_102850.1	牛	美国
无乳支原体	PG2	CU179680.1	NR_044667.2	绵羊、山羊	法国
丝状支原体丝状亚种	PG1	NC_005364.2	NR_074703.1	牛、水牛	瑞典
丝状支原体山羊亚种	PG3		NR_044772.1	山羊	土耳其
山羊支原体山羊亚种	G5		U26041.1	山羊	瑞典

注:表中无登录号处表示未使用该菌株的相应序列。

Note: If there is no registration number in the table, the corresponding sequence of the strain is not used.

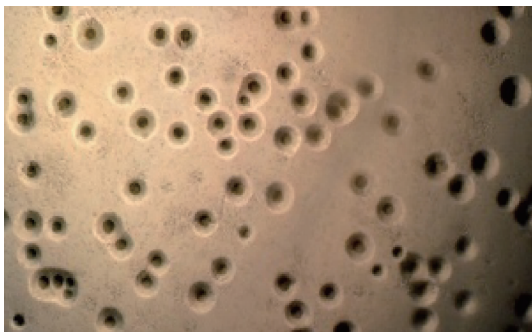


图1 分离株菌落形态(40X)

Fig. 1 Colony morphology of *Mycoplasma bovis* isolates (40X)

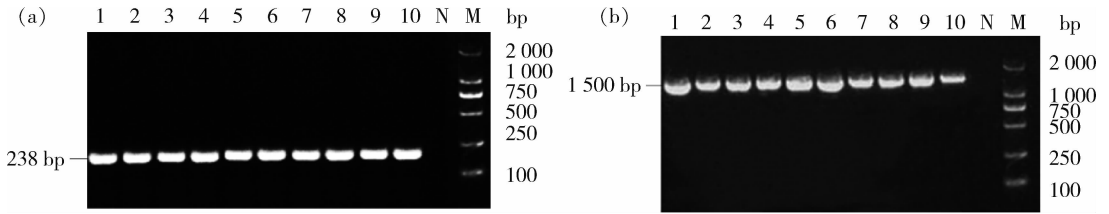
2.4 序列分析

2.4.1 同源性分析

uvrC 同源性分析结果显示,10 株西藏牦牛牛

支原体分离株之间同源性为 98.9%~100%;与我国牛支原体地方株同源性为 98.4%~100%;与日本株同源性为 98.4%~100%;与瑞士株同源性为 98.4%~100%;与国际标准株 PG45 的同源性为 98.4%~100%;与无乳支原体标准株 PG2 (Maga PG2) 的同源性为 76.6%~80.7%;与丝状支原体丝状亚种 SC 型 PG1 标准株 (MmmSC PG1) 的同源性为 56.3%~57.2%。

16S rRNA 基因同源性分析结果显示,10 株西藏牦牛牛支原体分离株之间序列同源性为 99.4%~100%;与我国牛支原体地方株的同源性为 99.1%~100%;与日本株同源性为 99.2%~100%;与匈牙利株的同源性为 99.1%~100%;与瑞士株同源性为 99.2%~100%;与 PG45 株同源性为 99.1%~99.9%;与 PG2 株的同源性为



M: DNA 标记 DL2 000; N: 阴性对照; 1~10 依次为分别为分离株 1~10 的扩增产物

M: Marker; N: negative control; 1-10 is the amplification products of the isolates 1-10 in turn

图 2 牛支原体分离株 *uvrC* 特异性基因(a)和 16S rRNA 基因(b)PCR 扩增

Fig. 2 Amplification of *uvrC* specific gene and 16S rRNA from *Mycoplasma bovis* isolates

98.2%~98.7%; 与 PG1、PG3、G5 的同源性为 80.1%~80.7%。

2.4.2 基因进化树分析

牦牛牛支原体 *uvrC* 进化树显示, 10 株西藏牦牛牛支原体分离株 *uvrC* 序列相似度较高, 且与牛支原体我国地方株、牛支原体日本株、牛支原体瑞士株、国际标准株 PG45 处于同一分支, 而与无乳支原体标准株 PG2 和丝状支原体丝状亚种 SC 型标准株 PG1 处于不同分支(图 3(a))。牦牛牛支原体 16S rRNA 基因进化树分析结果表明, 分离株与牛支原体标准株 PG45 处于同一分支, 亲缘关系较近, 但与无乳支原体标准株 PG2 处于不同分支, 因此证明上述分离株属于牛支原体。10 株牛支原体分离株与 13 株牛支原体参考株的分布在进化树上聚集为 3 大簇: 牛支原体分离株 Tibet-1、Tibet-2、Tibet-6、

Tibet-9 和参比株 08M、16M、CQ-W70、Ningxia-1、FJ-HJ、HB0801 株聚为一簇。其中, Tibet-1 和 Tibet-9 与 FJ-HJ 亲缘关系最近、Tibet-2 与 08M 亲缘关系最近、Tibet-6 与 16M 亲缘关系最近; 牛支原体分离株 Tibet-3、Tibet-4、Tibet-5、Tibet-10 和参比株 Hubei-1、JF4278、KG4397 聚为一簇。其中, Tibet-3、Tibet-4、Tibet-5 与 Hubei-1 亲缘关系最近、Tibet-10 与 JF4278 亲缘关系最近; 牛支原体分离株 Tibet-7、Tibet-8 和牛支原体参比株 NM2012、MYC2、MYC22 聚为一簇。其中, Tibet-7 与 NM2012 亲缘关系最近、Tibet-8 与 MYC22 亲缘关系最近(图 3(b))。

本试验从 145 份样品中得到的 10 份纯培养物, 经菌落形态观察、生化鉴定、PCR 鉴定及序列分析, 证实其均为牛支原体, 其分离率为 6.90%(10/145)。

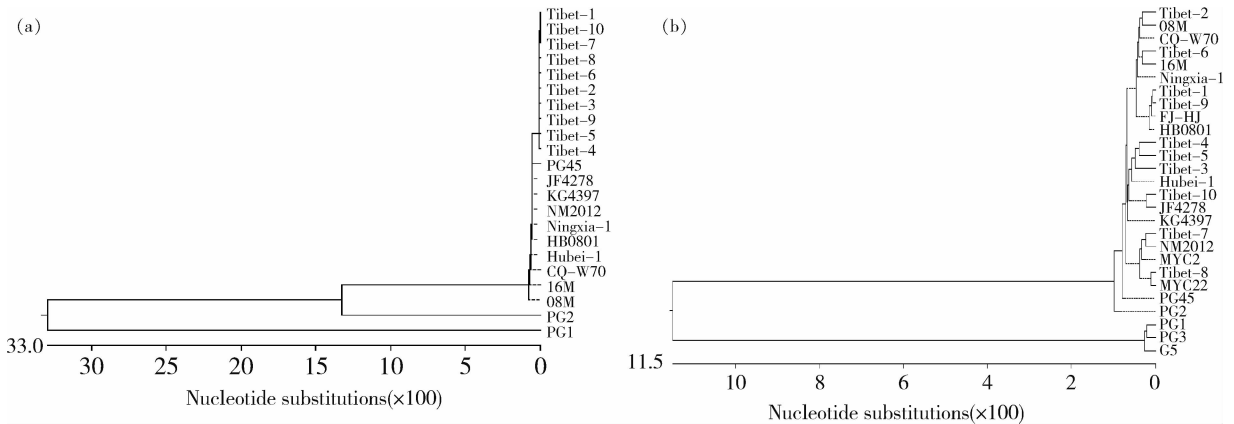


图 3 *uvrC* 特异性基因(a)和 16S rRNA 基因(b)基因进化树

Fig. 3 Evolutionary tree of amplification of *uvrC* specific gene (a) and 16S rRNA gene (b)

2.5 生长曲线测定

试验结果显示, 10 株分离物的 OD₆₃₀ 及平均 pH 变化趋势一致, 这里仅列出 3 株分离物的结果。根据 3 株西藏牦牛牛支原体分离株在 PPLO 液体培

养基中不同时间点的平均 OD₆₃₀ 及平均 pH 分别绘制生长曲线如图 4(a)、图 4(b) 所示。分离株在 PPLO 培养基中生长 126 h, 其中, 培养 24 h 内为迟缓期, 培养 42 h 开始进入稳定期, 78 h 后开始进

入衰亡期;3个分离株培养物的平均 pH 随着培养时间延长 pH 不断降低,其中 24~42 h 期间 pH 下

降最快,随后下降速度减慢,至 78 h 后几乎不再变化。

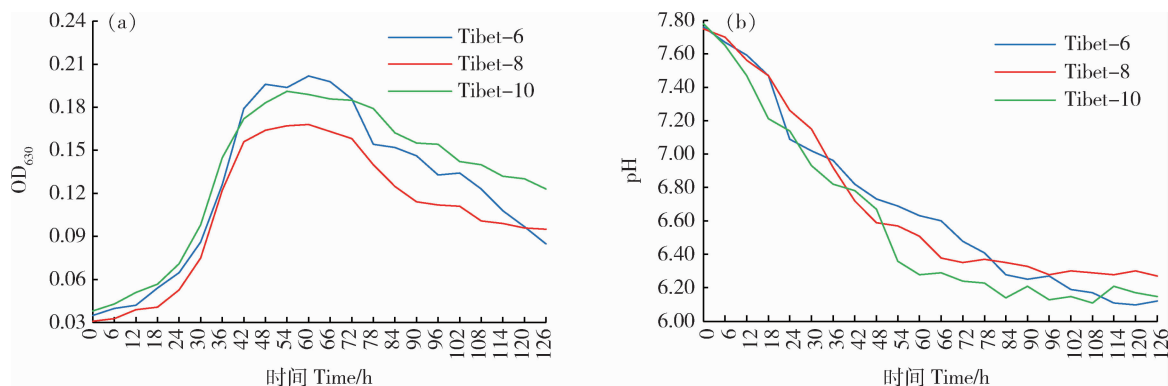


图 4 牛支原体分离株不同时间点 OD_{630} (a) 和 pH (b) 变化

Fig. 4 OD_{630} (a) and pH (b) of *Mycoplasma bovis* isolates at different time points

2.6 药敏试验

药敏试验结果如表 2 所示,所有分离株均对一种或多种药物产生了耐药,40% 的分离株对林可霉素耐药;30% 的分离株对阿奇霉素、环丙沙星耐药;

20% 的分离株对红霉素、氟苯尼考、大观霉素、氧氟沙星耐药;10% 的分离株对四环素、新霉素、链霉素、庆大霉素、恩诺沙星耐药,但 10 株牛支原体对强力霉素、卡那霉素均表现为敏感或中度敏感。

表 2 牛支原体分离株耐药性检测

Table 2 Antimicrobial susceptibility test of *Mycoplasma bovis* isolates

药物种类 Types of drugs	药物名称 Drug name	菌株序号 Strain number										耐药率/% Drug resistance rate
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
四环素类	强力霉素	S	S	S	I	S	S	S	S	I	S	0
	四环素	I	S	S	I	S	S	S	S	R	I	10
大环内酯类	阿奇霉素	R	S	I	R	I	R	I	I	I	S	30
	红霉素	I	I	I	R	I	I	I	R	I	I	20
酰胺醇类	氟苯尼考	R	S	I	S	I	S	I	I	I	R	20
	新霉素	I	I	I	I	I	I	I	R	S	I	10
	链霉素	S	I	I	R	S	S	S	I	S	I	10
氨基糖苷类	大观霉素	I	I	R	I	I	I	I	R	I	I	20
	庆大霉素	I	R	I	I	I	S	S	I	S	I	10
	卡那霉素	I	I	I	I	S	I	I	I	S	I	0
林可胺类	林可霉素	R	I	I	S	R	I	I	I	R	R	40
	环丙沙星	I	I	R	I	I	R	R	I	I	I	30
氟喹诺酮类	恩诺沙星	I	I	I	I	I	I	I	R	I	I	10
	氧氟沙星	I	R	I	S	I	I	I	R	I	S	20

注:S:敏感;I:中度耐药;R:耐药

Note: S: Susceptible; I: Intermediate resistant; R: Resistant

3 讨 论

牛支原体被公认为影响全球养牛业的一种重要病原体,目前已遍布英国、法国、德国、瑞士、澳大利亚、丹麦、墨西哥、西班牙、以色列以及北美各国^[20]。近十年来,全球相关研究者对此病原体进行了大量研究,到目前为止还没有有效的商业化疫苗来预防牛支原体病^[21],也没有彻底治疗此病的特效药物。临床常用抗生素虽有一定疗效,但随着使用次数和频率的增加,病原对药物的敏感性就会降低甚至产生耐药,带菌牛常常成为主要传染来源,这也是造成牛支原体感染率升高的重要原因。因此,进行牛支原体流行病学调查对于该病的监测和防控具有重要的现实意义。

2015 年,李坤等^[15,22]报道了 2012 和 2013 年间西藏牦牛支原体的感染状况,其感染率分别为 44.32% 和 47.44%,但未进行病原的分离鉴定。2017 年,本团队成员检测发现,西藏牦牛支原体感染率高达 46.10%^[23]。据资料显示,目前我国西藏、青海、甘肃和四川牦牛群中均存在牛支原体的感染^[24],且在西藏林芝地区牦牛、黄牛和犏牛感染率均较高^[25]。本研究在前期血清学调查基础上,采集牛支原体血清抗体检测为阳性且具有呼吸急促、咳嗽、食欲不佳和流鼻腔粘液等症状的病牛鼻腔粘液进行病原分离鉴定,并成功分离到 10 株牛支原体。同时,本研究也证实了病牛可通过鼻腔粘液排出病原体,这将对同群牛和环境造成污染,在西藏牦牛、黄牛混养、散养、半圈养模式下,则更容易造成病原在牛群环境中的扩散和蔓延。因此,养殖过程中应注意该病的监测,及时淘汰病牛,不引进阳性牛,尽量避免合群混养,定期进行环境消毒等。

牛支原体无细胞壁结构,其基因组仅为 10^6 bp 左右,缺少大多数代谢所需的酶,不发酵葡萄糖和乳糖,不能水解明胶和精氨酸,也不能分解尿素和甘露醇,因此体外培养难度大,需在培养基中加入马血清、丙酮酸钠、MEM 等物质以满足其对碳源和含氮化合物的营养需求,同时需向培养箱中通入 5% CO_2 。本试验从 145 份样品中分离到牛支原体 10 株,分离率仅为 6.90%,一方面可能由于此次样品采集的时间为春季,而非秋末冬初或冬末春初呼吸道病多发期;另一方面是由于牛支原体对营养要求苛刻,体外培养周期长、难度大;此外,牛支原体常与多杀巴氏杆菌、溶血曼氏杆菌等混合感染,抗生素往

往不能完全抑制杂菌的生长,分离中容易造成污染,降低分离率。

近年来,国内外研究学者围绕牛支原体膜蛋白、亚单位疫苗和灭活苗等进行了大量研究,但由于不同菌株在转录组学、膜蛋白结构组学上的差异,其免疫效果不容乐观。因此,具有强感染力和低毒力菌株的筛选,对研制确实安全有效的牛支原体疫苗极其迫切且意义重大,而牛支原体的分离鉴定是筛选优势菌株及牛支原体疫苗研究的前提和基础。分离株对数生长期、稳定期等测定,对今后开展病原分离培养、最佳传代时间选择、核酸提取及疫苗相关研究具有基础性作用。由于目前世界上仍没有用于预防牛支原体病的高效、稳定、商业化疫苗,抗生素的大量使用依然是目前控制牛支原体病的重要手段。然而,由于滥用抗生素导致的牛支原体耐药性的产生,已成为困扰养牛业的一大难题,正在逐步引起国内外相关人士的重视^[26]。本次所有牛支原体分离株均存在不同程度的耐药性,不同分离株对同一类药物的具体药物存在不同的敏感性,这可能与当地用药种类和频率有关。本研究为临床防控提供参考,为今后开展牛支原体致病机理、疫苗等研究奠定基础。临床中推荐选用强力霉素、卡那霉素进行治疗。本研究对西藏牦牛支原体病的治疗具有一定指导意义,临床中应制定合理的用药交替方案,同时采取综合性防控措施,避免对抗生素的过度依赖或大剂量使用。

4 结 论

本研究自采集的 145 份西藏牦牛鼻腔粘液样本中成功分离并鉴定了 10 株牛支原体,对其进行培养,培养 24 h 内为迟缓期,42 h 开始进入稳定期,78 h 后开始进入衰亡期;体外药物敏感性试验显示,所有分离株均对一种或多种药物产生了耐药,但 10 株牛支原体对强力霉素、卡那霉素均表现为敏感或中度耐药,为指导临床科学用药和防控提供依据。

参考文献 References

- [1] 姚慧,钟金城,姬秋梅,张成福,信金伟,陈智华,柴志欣. 西藏牦牛遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 生态学杂志, 2015, 34(11): 3278-3282
- Yao H, Zhong J C, Ji Q M, Zhang C F, Xin J W, Chen Z H, Chai Z X. Analysis of ISSR genetic polymorphism for Tibetan yak[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2015, 34(11): 3278-

- 3282 (in Chinese)
- [2] 孟庆辉, 陈永杏, 董红敏, 白加德, 刘艳菊, 郭青云, 成振华. 牦牛分布特点及其种群数量[J]. 家畜生态学报, 2017, 38(3): 80-85
Meng Q H, Chen Y X, Dong H M, Bai J D, Liu Y J, Guo Q Y, Cheng Z H. The distribution characteristics and populations of Yak[J]. *Journal of Domestic Animal Ecology*, 2017, 38(3): 80-85 (in Chinese)
- [3] 姬秋梅, 普穷, 达娃央拉, 次仁德吉, 达瓦曲吉, 张永清, 洛桑. 西藏牦牛资源现状及生产性能退化分析[J]. 畜牧兽医学报, 2003(4): 368-371
Ji Q M, Pu Q, Da W Y L, Ci R D J, Da W Q J, Zhang Y Q, Luo S. The situation of resources and productivity degradation of Yak in Tibet [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2003(4): 368-371 (in Chinese)
- [4] Mehinagic K, Pilo P, Vidondo B, Stokar-Regenscheit N. Coinfection of Swiss cattle with bovine parainfluenza virus 3 and *Mycoplasma bovis* at acute and chronic stages of bovine respiratory disease complex [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2019, 31(5): 674-680
- [5] Morton J, Malmo J, House J, Mein G, Izzo M, Penry J. *Mycoplasma bovis* in Australian dairy herds[J]. *Australian Veterinary Journal*, 2014, 92(9): 322-323
- [6] Hale H H, Helmboldt C F, Plastringe W N, Stulas E F. Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species [J]. *The Cornell Veterinarian*, 1962, 52(4): 582-591
- [7] 黎济申, 陈嘉棣, 王兆久, 赵洪兴, 张赋平, 戴维平, 乌正芳. 牛霉形体的分离及其对犏牛的致病力[J]. 畜牧与兽医, 1984(1): 8-9, 12
Li J S, Chen J D, Wang Z J, Zhao H X, Zhang B P, Dai W P, Wu Z F. Isolation of *Mycoplasma bovis* and its pathogenicity to calves [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 1984(1): 8-9, 12 (in Chinese)
- [8] 石磊, 龚瑞, 尹争艳, 周勇, 裴洁, 胡智斌, 王利霞, 胡长敏, 刘涛, 陈颖钰, 廖娟红, 赵俊龙, 陈焕春, 郭爱珍. 肉牛传染性牛支原体肺炎流行的诊断[J]. 华中农业大学学报, 2008(5): 629-633
Shi L, Gong R, Yin Z Y, Zhou Y, Pei J, Hu Z B, Wang L X, Hu C M, Liu T, Chen Y Y, Miao J H, Zhao J L, Chen H C, Guo A Z. Diagnosis of cattle infectious *Mycoplasma bovis* Pneumonia[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2008(5): 629-633 (in Chinese)
- [9] 冉智光, 谢建华, 骆璐, 杨泽林, 凌洪权, 苏承忠, 熊仲良, 范伟兴, 米自由. 我国部分地区牛支原体肺炎和关节炎的病原体诊断[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(1): 40-43
Ran Z G, Xie J H, Luo L, Yang Z L, Ling H Q, Su C Z, Xiong Z L, Fan W X, Mi Z Y. Etiological diagnosis of *Mycoplasma bovis* pneumonia and arthritis in some provinces in China [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2010, 32(1): 40-43 (in Chinese)
- [10] 邵倩. 宁夏地区永宁县牛支原体病流行病学调查及防治技术研究[D]. 甘肃: 甘肃农业大学, 2017
Shao Q. Epidemiological investigation and control technology of *Mycoplasma bovis* in Yongning County, Ningxia [D]. Gansu: Gansu Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [11] 王桂玲, 吴胜昔, 梁望旺, 马培杰, 曾政, 黄恒, 李志. 牛支原体检测方法研究进展[J]. 重庆理工大学学报: 自然科学, 2019, 33(1): 166-171
Wang G L, Wu S X, Liang W W, Ma P J, Zeng Z, Huang H, Li Z. Progress in detection of *Mycoplasma Bovis*[J]. *Journal of Chongqing University of Technology: Natural Science*, 2019, 33(1): 166-171 (in Chinese)
- [12] 侯轩, 付萍, 张海燕, 张跃伟, 吴文学. 牛支原体的环介导等温扩增快速检测技术研究[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(2): 218-224
Hou X, Fu P, Zhang H Y, Zhang Y W, Wu W X. Development of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of mycoplasma bovis [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20(2): 218-224 (in Chinese)
- [13] 师燕霞, 凌晨, 杨铭伟, 张锐, 朱玲, 阮东, 王静梅, 剡根强. 新疆不同地区牛支原体分离株 oppD/F 基因的克隆和序列分析[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(2): 311-315
Shi Y X, Ling C, Yang M W, Zhang R, Zhu L, Ruan D, Wang J M, Yan G Q. Cloning and sequencing of oppD/F gene of *Mycoplasma bovis* isolated from different regions of Xinjiang [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2018, 38(2): 311-315 (in Chinese)
- [14] 李建, 高航飞, 安维雪, 牛同州, 赵永春, 遇培之, 满都拉图, 乌力吉那仁, 王建国, 申之义. 牛支原体 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(6): 1059-1064
Li J, Gao H F, An W X, Niu T Z, Zhao Y C, Yu P Z, Man D L T, Wu L J N R, Wang J G, Shen Z Y. The construction of the TaqMan real-time fluorescent quantitation PCR detection method for the *Mycoplasma bovis* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(6): 1059-1064 (in Chinese)
- [15] 李坤, 韩照清, 赵晓东, 谢荣清, 官久强, 李家奎. 西藏和四川红原地区牦牛支原体流行病学调查[J]. 中国奶牛, 2015(5): 29-31
Li K, Han Z Q, Zhao X D, Xie R Q, Guan J Q, Li J K. Seroprevalence of *Mycoplasma bovis* infection in Yaks in Tibet and Hongyuan of Sichuan, China [J]. *China Dairy Cattle*, 2015(5): 29-31 (in Chinese)
- [16] 翟肖辉. 牛支原体重组酶聚合酶扩增(RPA)检测方法的建立和样品 DNA 提取方法的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019
Zhai X H. Establishment of recombinase polymerase amplification(RPA) for detection of *mycoplasma bovis* and the method for sample DNA extraction [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese)
- [17] 白智迪. 牛支原体 LAMP 检测方法的建立及体外传代致弱菌