

刘芳, 乌志勇, 王金玲, 等. 绵羊肺炎支原体的分离鉴定及药物敏感性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (11): 109-113.

LIU F, WU Z Y, WANG J L, et al. Isolation, identification and drug sensitivity of *Mesomycoplasma ovipneumoniae* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (11): 109-113.

绵羊肺炎支原体的分离鉴定及药物敏感性分析

刘芳[#], 乌志勇[#], 王金玲, 苗苗, 苏日娜, 白伟琴, 卡楚拉, 格日勒图^{*}

(内蒙古农业大学兽医学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 旨在通过收集陕西榆林市某羊场具有呼吸道病史的绵羊肺组织样本, 开展病原微生物的分离鉴定及药敏试验。样本经培养后分离得到支原体疑似菌株, 对可疑菌株进行形态学、生理生化鉴定, 确定为疑似绵羊肺炎支原体 (*Mesomycoplasma ovipneumoniae*)。通过 16S rRNA 特异性引物扩增获得 361 bp 目的基因片段。经测序后 BLAST 分析发现, 分离菌株的基因片段均与绵羊肺炎支原体的 Y98 参考株 (GenBank 登录号: NR_025989.1) 同源性为 97.81%, 在遗传进化树同一分支, 将其命名为绵羊肺炎支原体 SY-1 菌株。按照梯度稀释 SY-1 菌液, 采用解脲支原体 (CCU) 计数方法绘制其生长曲线, 结果发现绵羊肺炎支原体的最高菌量可达到 10^9 CUU。药物敏感性试验结果显示, SY-1 对多西环素高度敏感, 对环丙沙星中度敏感, 对头孢曲松、庆大霉素、苯唑西林、恩诺沙星和阿奇霉素均显示为低敏感度, 而对利福平不敏感。本试验为羊场呼吸道疾病的防治和临床用药提供了参考。

关键词: 绵羊肺炎支原体; 分离鉴定; 遗传进化树; 药物敏感性试验

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)11-0109-05

Isolation, identification and drug sensitivity of *Mesomycoplasma ovipneumoniae*

LIU Fang[#], WU Zhiyong[#], WANG Jinling, MIAO Miao, SU Rina, BAI Weiqin, Kachula, Geriletu^{*}

(College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: In this study, sheep lung tissue samples were collected from a sheep farm with a history of respiratory diseases; and isolation and identification of pathogenic microorganisms, and drug sensitivity tests were conducted. The samples were first purified and cultured through passage to obtain suspicious strains. Then, morphological, physiological, biochemical, and molecular biological identification of the suspicious strains of *Mesomycoplasma ovipneumoniae* was conducted. A 361 bp target gene fragment was amplified by PCR with 16S rRNA-specific primers. After sequencing, BLAST analysis revealed that the gene fragments of all three strains shared 97.81% homology with the *M. ovipneumoniae* Y98 reference strain (GenBank: NR_025989.1), which was named as *M. ovipneumoniae* SY-1 strain in the same branch of the genetic evolution tree. Finally, SY-1 bacterial solution was diluted in gradient and its growth curve was plotted using the CCU counting method. The results showed that the highest bacterial count of *M. ovipneumoniae* could reach 10^9 CUU. The drug sensitivity test results showed that SY-1 was highly sensitive to doxycycline, moderately sensitive to ciprofloxacin, and lowly sensitive to ceftriaxone, gentamicin, oxacillin, enrofloxacin, and azithromycin, but not sensitive to rifampicin. This study provided reference for the prevention and treatment of respiratory diseases in sheep farms and for clinical medication.

Keywords: *Mesomycoplasma ovipneumoniae*; isolation and identification; genetic evolution tree; drug susceptibility test

绵羊肺炎支原体 (*Mesomycoplasma ovipneumoniae*) 是一种无细胞壁微生物, 通常被认为是绵羊和山羊慢性非进行性肺炎的主要病原体^[1]。绵羊肺炎支原体强毒株感染的暴发经常发生在来自不同羊群的羔羊

中, 通常与大雨、动物运输、恶劣的气候条件以及将患病动物引入易感畜群有关。患病动物或带菌动物的分泌物中均含有病菌, 易感动物吸入病菌后, 患病明显的动物肺部有灰色或红色的实变区域, 伴有明显的胸膜炎和黄色液体胸腔积液, 肺脏横截面出现细颗粒状纹理和肝样变^[2]。

小反刍动物的呼吸系统疾病造成了全球巨大的经济损失, 在美国估计超过 10 亿美元。一般认为, 绵羊肺炎支原体的原发性感染加剧了由其他微生物定殖组织引起的临床症状^[3]。在一项关于非典型性肺炎的大体病变研究中, Sheehan 等^[4]对屠宰场来源的羊

收稿日期: 2023-10-29; 修回日期: 2024-09-22

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目 (2021MS03047); 内蒙古农业大学兽医学院教学科技项目 (SYKJYB202303)

第一作者: 刘芳, 女, 蒙古族, 博士; 乌志勇, 男, 蒙古族, 硕士。[#]共同第一作者

^{*}通信作者: 格日勒图, 蒙古族, 博士, 研究方向为兽医微生物与免疫学, E-mail: grltv@imau.edu.cn。

肺脏进行了检测,在90%的病例中检测出了绵羊肺炎支原体,在30%的病例中检测出溶血曼氏杆菌和副流感病毒3型,而精氨酸支原体在不到2%的病例中检测到,这说明了绵羊肺炎支原体的重要性。在我国,先后在四川和宁夏分离到绵羊肺炎支原体,近年来由绵羊肺炎支原体引起的疾病在我国甘肃、四川、内蒙古、新疆等地广泛流行^[5]。

本试验通过对绵羊肺炎支原体的分离鉴定及药敏试验,为陕西榆林地区绵羊支原体肺炎的有效防治提供了参考,并为该菌的实验室诊断以及新型疫苗研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 病料来源

陕西省榆林市某羊场发生呼吸道疾病,初步诊断为支原体肺炎,从该羊场收集6份患有明显病理变化的肺脏组织病料,用于试验。

1.2 主要试剂

姬姆萨染色液购自北京索莱宝科技有限公司,绵羊血琼脂平板购自广东环凯微生物科技有限公司,PPLO培养基购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司,核酸染料购自北京百泰克生物技术有限公司,支原体染色法(即二烯烃法)试剂购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 病原分离

在生物安全柜中将病料组织用外科剪剪至黄豆大小,尽量剪碎,剪碎的组织移至3 mL自制海弗里克培养基的试管中,在37℃恒温培养箱中培养3~5 d,并观察培养基颜色是否发生变化,若颜色变黄、浑浊、有沉淀或出现菌膜,则用0.45 μm滤器过滤再进行传代,若颜色变黄清亮透明可直接传代。盲传3~5代后,转接到固体培养基上,在37℃含5% CO₂条件下的恒温培养箱中倒置培养3~5 d,3 d后使用光学显微镜观察,挑取可疑菌落进行传代和PCR鉴定^[6-7]。

1.4 分离菌株生长曲线的绘制

设置3组平行对照,每组12支1.5 mL离心管。进行10倍梯度稀释,设阴性对照(不加菌液)。3组离心管置于37℃生化培养箱中培养,每隔12 h观察颜色变化,以菌液颜色发生变化的最大稀释倍数记为解脲支原体(CCU)值。从传代0 h开始,每隔24 h观察并记录一次,汇总结果^[8]。

1.5 病原鉴定

1.5.1 形态学鉴定

将疑似绵羊肺炎支原体分离株纯培养物接种于固体培养基,在37℃、5%~8% CO₂的条件下倒置培养

3~5 d后,若出现针尖大小密集的菌落,3 d后在光学显微镜下观察菌落^[9]。分离株菌落经二烯烃法染色后,如果是绵羊肺炎支原体,则菌落中心被染成深蓝色,该染色法可保持30 min内不褪色^[10]。

1.5.2 生理生化特性鉴定

糖酵解试验:将分离菌株接种于含葡萄糖的液体培养基中,同时设空白对照,置于37℃含5% CO₂的条件下在培养箱中连续培养3~5 d,若液体培养基颜色发生改变,糖发酵试验为阳性,颜色未改变则为阴性。

分解尿素试验:将分离菌株接种含尿素的液体培养基中,同时设空白对照,置于37℃含5% CO₂的条件下在培养箱中连续培养3~5 d。若尿素液体培养基颜色发生改变,则分解尿素试验为阳性,未发生变化则为阴性。

精氨酸水解试验:将分离株接种于精氨酸液体培养基,同时设空白对照,置于37℃含5% CO₂的条件下连续培养3~5 d,以液体培养基颜色变为紫红色判为阳性,不变为阴性。

氯化四氮唑还原试验:在支原体液体培养基中加入氯化四氮唑,不加酚红指示剂,同时设空白对照和阳性对照,置于37℃含5% CO₂的条件下连续培养1~2周,液体培养基颜色变为红色为阳性,不变为阴性。

1.5.3 分子鉴定与序列分析

细菌基因组DNA提取:按照艾科瑞公司提供的细菌基因组提取试剂盒说明提取分离菌株的基因组DNA。参考文献[11]进行16S rRNA片段的PCR扩增。LMF1上游引物:5'-TGAACGGAATATGTTAGC-TT-3',LMR1下游引物:5'-GACTTCATCCTGCAC-TCTGT-3'。PCR扩增目的片段大小为361 bp。由上海桑尼股份有限公司进行引物合成。PCR反应体系为20 μL:DNA聚合酶混合液10 μL,ddH₂O 6 μL,模板DNA 2 μL,上、下游引物各1 μL。PCR反应程序:94℃预变性10 min;94℃变性30 s,退火55℃ 30 s,延伸72℃ 30 s,共30个循环;最后延伸72℃ 10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测。

将PCR产物进行胶回收后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,在NCBI的BLAST上进行检索,将分离菌株测序后的16S rRNA序列与GenBank相关序列进行比对,使用MEGA 7软件绘制遗传进化树。

1.6 药物敏感性试验

取对数生长期的菌液备用,采用药敏纸片扩散法,将菌液均匀涂布于固体培养基上,37℃恒温培养箱中培养3~5 d,测量固体培养基平板中抑菌圈的

直径大小。判定结果以抑菌圈直径大小作为依据，高度敏感为抑菌圈 15 mm 以上，中度敏感为抑菌圈 10~15 mm，低度敏感为抑菌圈 10 mm 下，无抑菌圈则视为不敏感^[12]。

2 结果与分析

2.1 分离纯化

将菌液传至 3~5 代后，取 150 μ L 稳定生长的菌

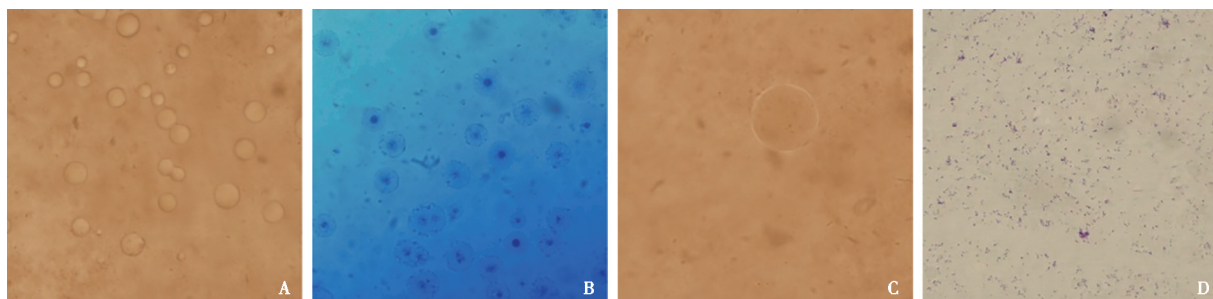


图 1 未染色 (40 \times); B. 二烯烃法染色 (40 \times); C. 未染色 (100 \times); D. 姬姆萨染色 (1 000 \times)。

图 1 分离菌形态学鉴定

2.2 分离菌株生长曲线

由图 2 可见，0~12 h 为分离菌株的生长迟缓期，12~132 h 为对数生长期，132~168 h 为生长稳定期，168~240 h 为衰亡期。

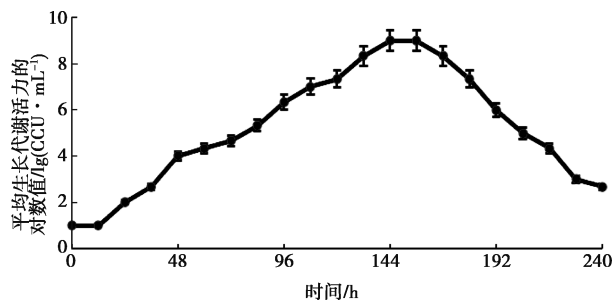


图 2 绵羊肺炎支原体生长曲线

2.3 生化试验

由表 1 可见，分离菌葡萄糖发酵试验为阳性，氯化四氮唑还原试验为阳性，精氨酸水解和水解尿素试验为阴性，符合绵羊肺炎支原体生化特征。

表 1 生化试验分析

项目	判定结果	判定依据
葡萄糖发酵试验	+	试验管变黄，对照管不变
精氨酸水解试验	-	试验管、对照管均不变色
水解尿素试验	-	试验管、对照管均不变色
氯化四氮唑还原试验	+	试验管变红，对照管不变色

注：+表示阳性，-表示阴性。

液均匀的涂在固体培养基上，在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 条件下培养箱内培养 3~5 d 后，在显微镜下可见菌落光滑，向琼脂凹陷，无中心脐菌落 (图 1A)。经二烯烃法染色，可见明显的“煎蛋样”菌落 (如图 1B)。在 100 \times 镜下可见边缘钝圆，透明菌落 (如图 1C)。姬姆萨染色为淡紫色球杆状，疑似绵羊肺炎支原体 (如图 1D)。

2.4 PCR 鉴定

由图 3 可见，16S rRNA 基因扩增片段的电泳条带用凝胶成像仪分析，出现预期大小条带 (361 bp)。

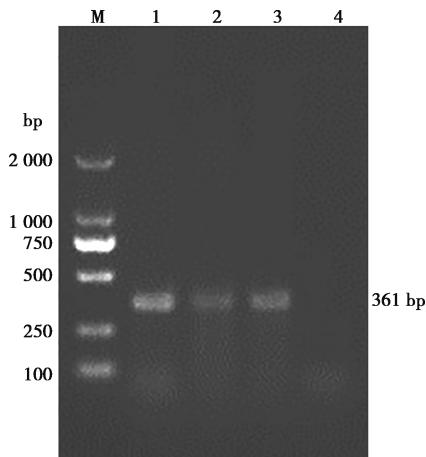


图 3 SY-1 特异性基因 PCR 检测

2.5 16S rRNA 基因序列遗传进化树分析

分离菌与绵羊肺炎支原体 Y98 参考株 16S rRNA 基因序列同源性为 97.81%。通过绘制遗传进化树，结果显示分离菌与绵羊肺炎支原体 Y98 (NR_025989.1) 在同一分支上 (图 4)，命名分离株为绵羊肺炎支原体 SY-1。

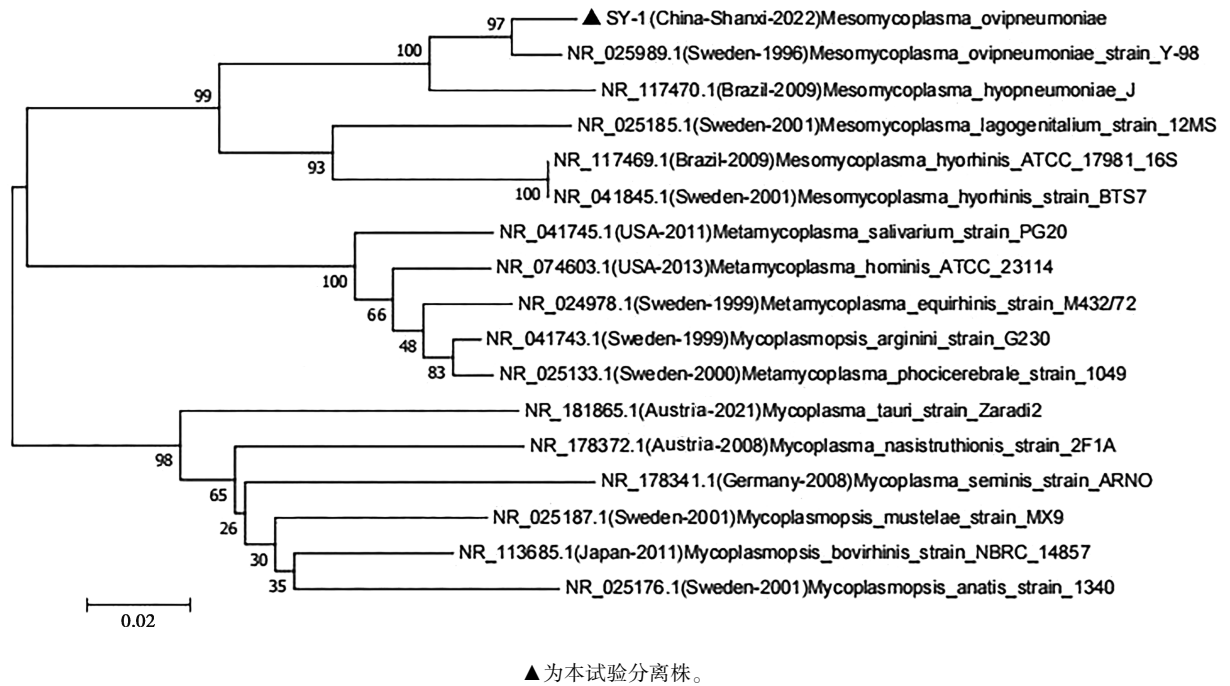


图 4 绵羊肺炎支原体 16S rRNA 基因序列发育进化树

2.6 药物敏感性试验

由表 2 可见，分离株 SY-1 对多西环素高度敏感，对环丙沙星中度敏感，对头孢曲松、庆大霉素、苯唑西林、恩诺沙星和阿奇霉素低度敏感，对利福平不敏感。

表 2 药物敏感性测定

药物	抑菌圈直径/mm	敏感度
多西环素	20	+++
头孢曲松	5	+
庆大霉素	6	+
苯唑西林	3	+
利福平	0	-
恩诺沙星	2	+
环丙沙星	11	++
阿奇霉素	7	+

注：无抑菌圈为不敏感（-），抑菌圈直径<10 mm 为低度敏感（+），10~15 mm 为中度敏感（++），>15 mm 为高度敏感（+++）。

3 讨论

本试验分离的菌株 SY-1 在固体培养基上生长时，肉眼可观察到呈针尖样大小的无色透明菌落，低倍镜下观察无中心脐。分离株 SY-1 与杜奕州^[7]所分离的绵羊肺炎支原体在形态学上一致。分离株通过二烯烃法染色后在显微镜下观察，可看到支原体菌落的

中心被染液染成深蓝色，菌落中心周围染为浅蓝色，这与胡政香等^[13]的染色结果一致。菌体经姬姆萨染色法呈淡紫色，球形、杆状、灯泡状等不规则形态，这与王紫阳^[14]的染色结果一致。分离株生理生化结果显示，葡萄糖发酵试验呈阳性，水解尿素试验呈阴性，氯化四氮唑还原试验呈阳性，精氨酸水解试验呈阴性，符合绵羊肺炎支原体的基本特性。在本试验中，从 SY-1 株的生长曲线结果可以看到，12~132 h 为 SY-1 株生长的对数生长期，该期时间长并且呈阶段式增长，比许健等^[15]分离的绵羊肺炎支原体菌株生长速度慢，这种结果可能与不同分离菌株的特异性，以及不同培养基营养成分不同有关。药物敏感性试验结果显示，SY-1 对多西环素高度敏感，对恩诺沙星低度敏感，这与邱添^[8]报道的药敏试验结果一致，与吴皓^[16]的试验结果有差别。不同地区分离的绵羊肺炎支原体菌株对药物的敏感性有所不同，可能与当地的药物使用情况有关，因此在预防治疗该病时应因地制宜、科学用药。

综上所述，本试验从陕西榆林某羊场病死绵羊的肺脏中分离出绵羊肺炎支原体疑似菌株，经过传统分离培养生化试验以及分子生物学方法最后鉴定该菌株为绵羊肺炎支原体，并对其进行了药物敏感性试验，确定敏感性临床药物为多西环素。研究结果为陕西榆林地区绵羊支原体肺炎的防控提供了依据。

参考文献:

- [1] CHEN J, ZHOU Y, ZHU E, et al. *Mycoplasma ovipneumoniae* induces caspase-8-dependent extrinsic apoptosis and p53- and ROS-dependent intrinsic apoptosis in murine alveolar macrophages [J]. *Virulence*, 2021, 12 (1): 2703-2720.
- [2] MOUSA W S, ZAGHAWA A A, ELSIFY A M, et al. Clinical, histopathological, and molecular characterization of *Mycoplasma* species in sheep and goats in Egypt [J]. *Veterinary World*, 2021, 14 (9): 2561.
- [3] NICHOLAS R, AYLING R, MCAULIFFE L. *Mycoplasma* disease of ruminants [M]. Wallingford: CAB International, 2008: 169-198.
- [4] SHEEHAN M, CASSIDY J P, BRADY J, et al. An aetiopathological study of chronic bronchopneumonia in lambs in Ireland [J]. *The Veterinary Journal*, 2007, 173 (3): 630-637.
- [5] 孙红妹, 冯志新. 支原体感染实验室诊断技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 176-184.
- [6] AHMAD F, KHAN H, KHAN F A, et al. The first isolation and molecular characterization of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* Pakistan strain; a causative agent of contagious caprine pleuropneumonia [J]. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2021, 54 (4): 710-717.
- [7] 杜奕州. 新疆南疆部分地区绵羊肺炎支原体分离培养及鉴定 [D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2020.
- [8] 邱添. 江苏部分地区羊传染性胸膜肺炎的流行病学及病原学特性研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2022.
- [9] 张轩. 绵羊肺炎支原体多表位疫苗的研究及免疫试验 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [10] 剡文亮, 冯广余, 杨铭伟, 等. 致萨福克羊呼吸道感染绵羊肺炎支原体的分离鉴定 [J]. *石河子大学学报 (自然科学版)*, 2016, 34 (3): 291-294.
- [11] MCAULIFFE L, HATCHELL F M, AYLING R D, et al. Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in *Pasteurella*-vaccinated sheep flocks with respiratory disease in England [J]. *Vet Rec*, 2003, 153: 687-688.
- [12] 高媛. 绵羊肺炎支原体生长曲线的测定及灭活疫苗的制备 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.
- [13] 胡政香, 乔军, 孟庆玲, 等. 绵羊肺炎支原体的分离鉴定及其 HSP70 基因遗传多样性 [J]. *贵州农业科学*, 2015, 43 (6): 113-115.
- [14] 王紫阳. 某规模化羊场羊支原体肺炎的流行病学调查及免疫方案的初步制订 [D]. 石河子: 石河子大学, 2022.
- [15] 许健, 储岳峰, 赵萍, 等. 绵羊肺炎支原体 GH3-3 株在改良 KM2 培养基中的增殖情况 [J]. *动物医学进展*, 2011, 32 (11): 46-48.
- [16] 吴鹂. 绵羊肺炎支原体 LY-1 株分离鉴定及 HSP70 P30 基因克隆和序列分析 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2017.