

安嘉琛, 贺乾, 马利, 等. 绵羊咽拭子中牛生殖支原体的分离与鉴定[J]. 山西农业科学, 2025, 53(3): 122-129.

AN J C, HE Q, MA L, et al. Isolation and identification of *Mycoplasma bovis* from throat swabs of sheep[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2025, 53(3): 121-127.

doi:10.3969/j.issn.1002-2481.2025.03.15

绵羊咽拭子中牛生殖支原体的分离与鉴定

安嘉琛¹, 贺乾¹, 马利², 王彬¹, 耿建军¹

(1. 山西农业大学 动物医学学院, 山西 晋中 030801; 2. 山西晋农生物科技有限公司, 山西 晋中 030800)

摘要:为确认绵羊肺炎的病原体中是否存在支原体(*Mycoplasma*)及其类型,采用分子生物学鉴定和支原体分离培养的方法,对疑似患病绵羊的鼻拭子和咽拭子样本进行检测。在分子生物学检测中,利用支原体特异性引物进行PCR扩增,琼脂糖凝胶电泳结果证实样本中存在支原体感染。同时,利用改良的Thiaucourt's培养基开展支原体分离培养工作,通过连续传代获得纯化培养物。在固体培养基上,培养物菌落呈现出典型的“煎蛋”形态,经Dienes染色后呈现蓝色,符合支原体形态学特征。为进一步明确菌株类型,通过PCR特异性扩增菌株的16S rRNA序列,并对扩增产物进行测序,将所得序列与GenBank数据库中已知的支原体序列进行比对分析及构建系统进化树。结果显示,该菌株与牛生殖支原体(*Mycoplasma bovis*, GenBank: AP017902.1)的16S rRNA基因序列一致性高达99.7%,且在进化树上与多株牛生殖支原体聚于同一分支,确认该菌株属于牛生殖支原体。综上所述,该研究从绵羊的咽拭子中成功分离出1株牛生殖支原体。

关键词:绵羊;肺炎;支原体;分子生物学;PCR;牛生殖支原体

中图分类号:S852.62 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2481(2025)03-0121-07

Isolation and Identification of *Mycoplasma bovis* from Throat Swabs of Sheep

AN Jiachen¹, HE Qian¹, MA Li², WANG Bin¹, GENG Jianjun¹

(1. College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China;

2. Shanxi Jinnong Biotechnology Co., Jinzhong 030800, China)

Abstract: To confirm the presence of *Mycoplasma* and its type among the pathogens of pneumonia in sheep, in this study, nasal and pharyngeal swab samples were collected from sheep with suspected pneumonia using molecular biology identification and *Mycoplasma* isolation culture. In the molecular biology assay, *Mycoplasma*-specific primers were utilized for PCR amplification and agarose gel electrophoresis results confirmed the presence of *Mycoplasma* infection in the samples. Meanwhile, *Mycoplasma* isolation and culture work was carried out using modified Thiaucourt's medium, and purified cultures were obtained by subculturing. On the solid medium, the colonies exhibited the characteristic of "fried-egg" morphology and stained blue with Dienes stain, which was consistent with *Mycoplasma* morphological features. In order to further clarify the strain type, the 16S rRNA sequence of the strain was specifically amplified by PCR, and the amplified product was sequenced, and the resulting sequence was compared with the known *Mycoplasma* sequences in the GenBank database and the phylogenetic tree was constructed. The results showed that the 16S rRNA gene sequence of the isolated strain shared 99.7% identity with that of *Mycoplasma bovis* (GenBank: AP017902.1) and was clustered within the same phylogenetic branch as several *M. bovis* strains, confirming its classification as *Mycoplasma bovis*. In conclusion, a strain of *Mycoplasma bovis* was successfully isolated from the pharyngeal swabs of sheep in this study.

Keywords: sheep; pneumonia; *Mycoplasma*; molecular biology; PCR; *Mycoplasma bovis*

支原体(*Mycoplasma*)是最小的原核细胞型微生物,在生物学分类上虽广义归属细菌,但因其独

收稿日期:2024-08-07

基金项目:山西省现代农业产业技术体系建设专项(2023-14)

作者简介:安嘉琛,本科在读,动物医学专业,E-mail:1376153811@qq.com

通信作者:耿建军,教授,博士,主要从事动物组织胚胎发育、羊驼生物工程研究,E-mail:dwyxygj@126.com

特的表型特征,显著区别于传统细菌。支原体的细胞很小(大小为0.1~0.3 μm),无细胞壁,因此,可以通过常规0.22、0.45 μm孔径的滤菌器,且对抑制细胞壁合成的青霉素类抗生素不敏感^[1]。支原体感染在养殖业中是一个普遍存在的问题,影响着不同种类的动物,包括牛、绵羊、山羊、猪等,常常引起动物的呼吸道疾病、生殖系统疾病和其他健康问题。随着养殖业的发展和养殖规模的扩大,支原体感染已经成为困扰养殖业的主要传染性疾

病之一。呼吸道疾病是绵羊一种常见的疾病,患病绵羊表现为咳嗽、体温升高、厌食等典型症状,伴随生长缓慢,产奶量减少,这些症状不仅会影响绵羊的健康,还会导致饲料转化效率降低,疾病恶化,甚至会导致绵羊死亡,给养殖户造成巨大的经济损失^[2-3]。绵羊呼吸道疾病涉及许多病原体,包括细菌如多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)和溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*),病毒如副流感病毒3型(Parainfluenza virus type 3),寄生虫如肺线虫以及支原体等。在大多数情况下,这些病原体是混合感染的,尤其是在管理不良或高应激的羊群中更为常见^[2]。其中,由支原体感染引发的羊支原体肺炎已经成为危害绵羊养殖业的重要传染病^[3-5]。

目前,国内主要流行绵羊肺炎支原体(*Mycoplasma ovipneumoniae*, Mo)和丝状支原体山羊亚种(*M. mycoides* subsp. *capri*, Mmc)^[6-7]。除此以外,精氨酸支原体(*M. arginini*)、山羊支原体山羊亚种(*M. capricolum* subsp. *Capricolum*)、山羊支原体山羊肺炎亚种(*M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*)和无乳支原体(*M. agalactiae*)都曾在羊呼吸道中被分离鉴定出来,甚至主要宿主为牛的牛支原体(*M. bovis*)、牛生殖支原体(*M. bovis genitalium*)也曾被分离鉴定出来^[6-10]。

山西省常有绵羊支原体感染发生,但由于缺乏地方流行支原体株分离及生物学特征分析的研究资料,给疾病的诊断与防控带来困难。本研究以山西某养殖场疑似感染肺炎的绵羊为试验对象,通过采集鼻拭子和咽拭子样本,综合运用分子生物学鉴定、支原体分离培养等技术,开展支原体的分离鉴定工作,获得地方流行株的研究资料,旨在为后续开发具有地域针对性的诊断试剂与疫苗产品提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验所用样品为采自临汾市乡宁县某绵羊养殖场(无牛)的疑似患有肺炎的绵羊鼻拭子和咽拭子。病羊表现精神沉郁,流鼻涕,呼吸困难,咳嗽。样本均保存在生理盐水中,4℃冷链运输到山西农业大学动物疾病诊断研究中心,添加甘油至终体积分数为20%, -80℃保存备用。

1.2 引物合成

根据已有的研究报道,合成支原体16S rRNA通用引物对(SF/SR)^[11], Mo、Mmc特异性引物对(M1B-F/M1B-R 和 MMMLC2-L/MMMLC2-R)^[12]和细菌16S rRNA基因扩增通用引物对(27F/1492R)^[13]。引物序列如下:SF:5'-GGGTGAGTACACGTACCTAAC-3';SR:5'-ACCGCGGCTGCTGGCACGTACCTAAC-3';M1B-F:5'-CGGAGCCATAAAGTTGTAAT-3';M1B-R:5'-CGAACTCCCGTGGATGCTA-3';MMMLC2-L:5'-CAATCCAGATCATAAAAAACCT-3';MMMLC2-R:5'-CTCCTCATATCCCCTAGAA-3';27F:5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 改良的 Thiaucourt's 培养基配制

改良的 Thiaucourt's 液体培养基包括基础液和辅助液2部分。配置1L改良的 Thiaucourt's 液体培养基的配方如下:基础液(700 mL): PPLO肉汤粉21 g,葡萄糖1 g,1%酚红2.5 mL,添加去离子水至700 mL,调节pH值至7.6,高压灭菌;辅助液(300 mL):丙酮酸钠2 g,酵母浸粉25 g,青霉素(8万/mL)12.5 mL,马血清200 mL,添加去离子水至300 mL,调节pH值至7.4,利用0.22 μm洁净滤器过滤除菌;将基础液和辅助液在生物安全柜中混合,配制成改良的 Thiaucourt's 液体培养基^[14]。改良的 Thiaucourt's 固体培养基是在上述液体培养基中添加12 g/L琼脂粉制成。

1.4 支原体的分离培养

将采集好的样品强力振荡,取500 μL溶液加入5 mL改良的 Thiaucourt's 液体培养基中,然后10倍稀释3个梯度,稀释倍数为10⁻¹、10⁻²和10⁻³,全部置于生化培养箱中37℃恒温培养;48 h后将各管培养液混合,并用0.22 μm洁净滤器过滤,同样

取 500 μL 滤液接种于 5 mL 改良的 Thiaucourt's 液体培养基后进行 10 倍稀释 3 个梯度;37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~5 d 后将每管培养液进行盲传;盲传至第 3 代,若培养基颜色不变弃之,若培养基颜色变黄则接种于改良的 Thiaucourt's 固体培养基;37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 5~7 d 后,用接种环挑取单个典型菌落接种于液体培养基固液交替培养,重复 3 次,获得纯化培养物。最终添加甘油至终体积分数为 30%, -80°C 保藏。

1.5 样品 PCR 检测

取 1.4 中初次培养的混合滤液离心收集沉淀,用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,并以此为模板,利用支原体 16S rRNA 通用引物及 Mo、Mmc 特异性引物进行 PCR 鉴定。反应体系:2 \times Taq Plus Master Mix II 5 μL ,上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL ,下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL ,模板 2 μL ,dd H₂O 补足至 10 μL 。支原体 16S rRNA 和 Mo 扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;保存 4 $^{\circ}\text{C}$ 。Mmc 扩增程序:将上述程序循环中退火温度改为 48 $^{\circ}\text{C}$,延伸时间改为 1 min。PCR 扩增结束后,产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 形态学观察

将长出菌落的固体平板培养基置于倒置显微镜下,观察支原体菌落形态。将支原体染色液稀释 10 倍,添加到固体培养基的菌落上,进行 2 min 的染色反应,后使用无菌水进行 3 次冲洗,以去除多余染色液。将经过染色处理的固体培养基置于倒置显微镜下,调整放大倍数和光源,仔细观察支原体菌落的形态和特征。

1.7 培养物 PCR 扩增及测序

取 2 mL 经过 3 次固液交替培养后的纯化培养物,提取基因组 DNA 作为模板,用细菌 16S rRNA 基因通用引物(27 F 和 1492 R)进行 PCR 扩增反应,反应体系为:2 \times Taq Plus Master Mix II 25 μL ,27 F (10 $\mu\text{mol/L}$) 1.5 μL ,1492 R (10 $\mu\text{mol/L}$) 1.5 μL ,模板 5 μL ,dd H₂O 补足至 50 μL 。扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 5 μL PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,若结果有且只有 1 条清晰的目的条带,将剩余 PCR 产物送至通用生物(安徽)股份有限公司进行双向测序。

1.8 序列分析与进化树构建

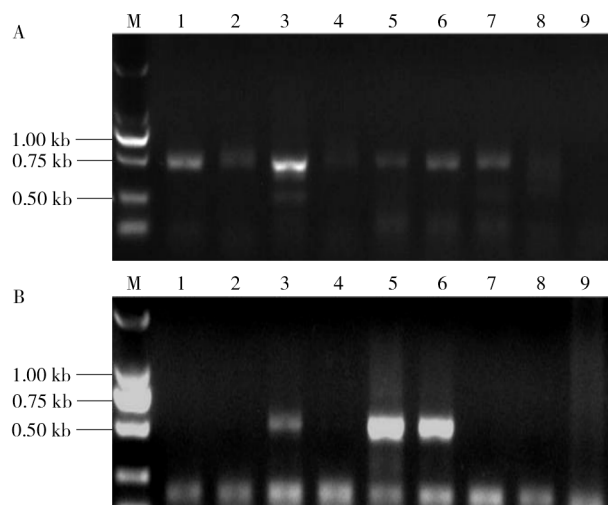
将双向测序的结果即 2 个互补的序列进行拼

接,获得 1 个长序列。将拼接后的序列上传至 NCBI 数据库进行比对。下载从患有呼吸道疾病的羊样本中分离鉴定出来的 Mo、Mmc、精氨酸支原体,山羊支原体山羊亚种,山羊支原体山羊肺炎亚种、无乳支原体、牛支原体,牛生殖支原体等支原体的 16S rRNA 序列,利用 MEGA X 软件,基于邻接法,以 1 000 次自展分析绘制遗传进化树,并分析遗传距离。

2 结果与分析

2.1 样本 PCR 鉴定结果

利用支原体 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增,结果显示,所有检测样本均得到 436 bp 的预期片段,其中,样本 4 和样本 8 获得的目的片段较暗,可能是样本中支原体的载量不多(图 1-A)。为进一步明确样本中支原体种类,采用 Mo 和 Mmc 的特异性引物分别进行 PCR 检测。利用 Mo 特异性引物扩增后有 3 个样本出现 511 bp 的预期片段(图 1-B),但是利用 Mmc 特异性引物扩增后未检测到特异性条带。根据上述结果可初步判定,样本中存在支原体感染,其中 3 个样本存在 Mo 感染,无 Mmc 感染。



A. 利用支原体 16S rRNA 引物进行 PCR;B. 利用 Mo 特异性引物进行 PCR。M.Trans 2K Plus DNA Marker;1~8. 样本基因组 DNA;9. 空白对照(以 dd H₂O 为模板)

A. PCR was performed using *Mycoplasma* 16S rRNA primers; B. PCR was performed using Mo-specific primers; M. Trans 2K Plus DNA Marker; 1~8. The genomic DNA of the samples; 9. Blank control(dd H₂O as template)

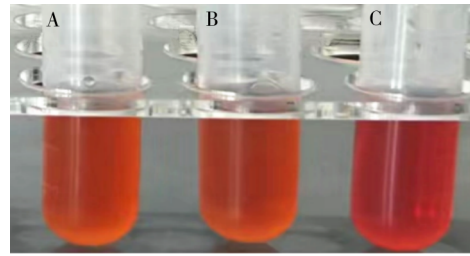
图 1 样本 PCR 检测结果

Fig.1 PCR results of samples

2.2 支原体形态学鉴定

改良的 Thiaucourt's 液体培养基中添加了 pH 指示剂酚红,初始状态下,培养液因 pH 呈弱碱性而呈现红色(图 2-C)。将初次培养获得的培养液进行过滤,随后接种于新鲜的液体培养基,37 °C 培养 3 d 后液体培养基的颜色变为黄色,且摇晃时无悬浮物,无沉淀,培养液清亮(图 2-A、B),这一现象与支原体代谢产酸导致培养液 pH 值下降、酚红变色的特征相吻合,表明支原体在液体培养基中的生长情况良好。将培养液接种在改良的 Thiaucourt's 固体培养基上,3~5 d 后培养基表面可见针尖大小的圆形菌落(图 3-A)。倒置显微镜下观察,菌落中心颜色比周围深,呈现“煎蛋”形态(图 3-B),进一步对这些菌落进行支原体染色,观察发现菌落中心呈现蓝色,边缘呈现淡蓝色(图 3-C)。综合液体培养基

变色特征、固体培养基菌落形态及染色结果,表明成功从样品中分离出支原体。

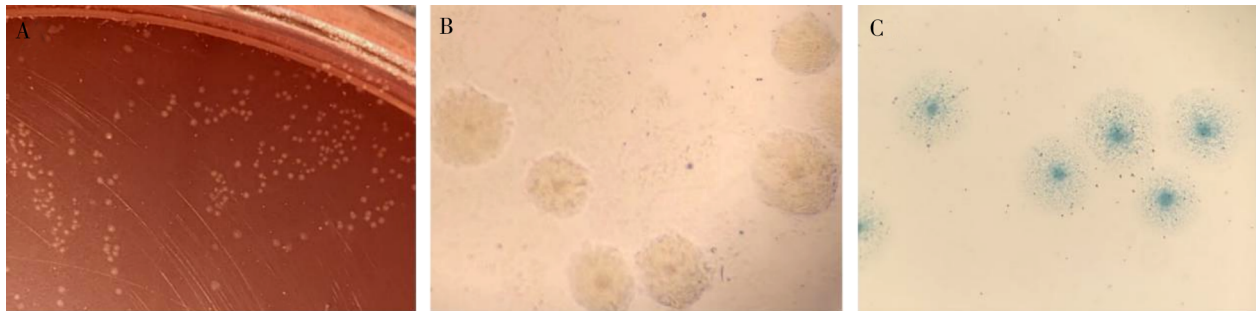


A 和 B. 接种培养物 3 d 后培养基状况; C. 未接种培养物培养基状况

A and B. Condition of the medium for 3 days after inoculated culture; C. Condition of the medium without inoculated culture

图 2 液体培养基支原体生长情况

Fig.2 Growth of *Mycoplasma* in the liquid medium



A. 培养基上肉眼可见的菌落形态; B. 倒置显微镜下的菌落形态(100×); C. 支原体染色液染色后倒置显微镜下的菌落形态(100×)

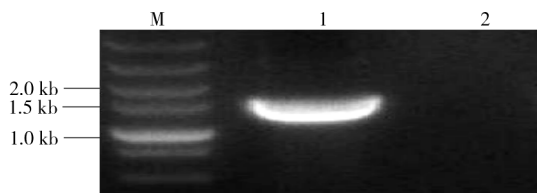
A. Visible colony morphology on the medium; B. Colony morphology under inverted microscope(100×); C. Colony morphology under inverted microscope after staining with *Mycoplasma* dye solution(100×)

图 3 改良 Thiaucourt's 固体培养基上菌落形态

Fig.3 Colony morphology on the modified Thiaucourt's solid medium

2.3 16S rRNA PCR 扩增结果及其序列分析

为了确定分离出的菌株类型,利用细菌的 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增,凝胶电泳后,得到 1 条 1 421 bp 的片段(图 4)。



M. Trans 5K Plus DNA Marker; 1. 分离菌株基因组 DNA; 2. 空白对照(以 dd H₂O 为模板)

M. Trans 5K Plus DNA Marker; 1. Genomic DNA of the isolated strain; 2. Blank control(dd H₂O as template)

图 4 16S rRNA 基因 PCR 结果

Fig.4 PCR result of 16S rRNA gene

将测序所得的序列通过 BLAST 工具与 NCBI 数据库进行同源比对分析,结果显示,分离到的菌株与牛生殖支原体(GenBank 中的接收号: AP017902.1)的相似性高达 99.7%,初步支持该菌株归属于牛生殖支原体。为进一步验证其进化地位,利用分离菌株和其他支原体的 16S rRNA 序列构建进化树,结果表明,分离菌株与来自英国(LR214970.1 和 AY121096.1)和德国(AY121097.1)的牛生殖支原体紧密聚合,共同构成一个具有显著遗传相关性的独立分支。而与其他种属的支原体及牛源近缘种均表现出显著的遗传距离(图 5)。根据以上结果,最终确认该分离菌为牛生殖支原体。

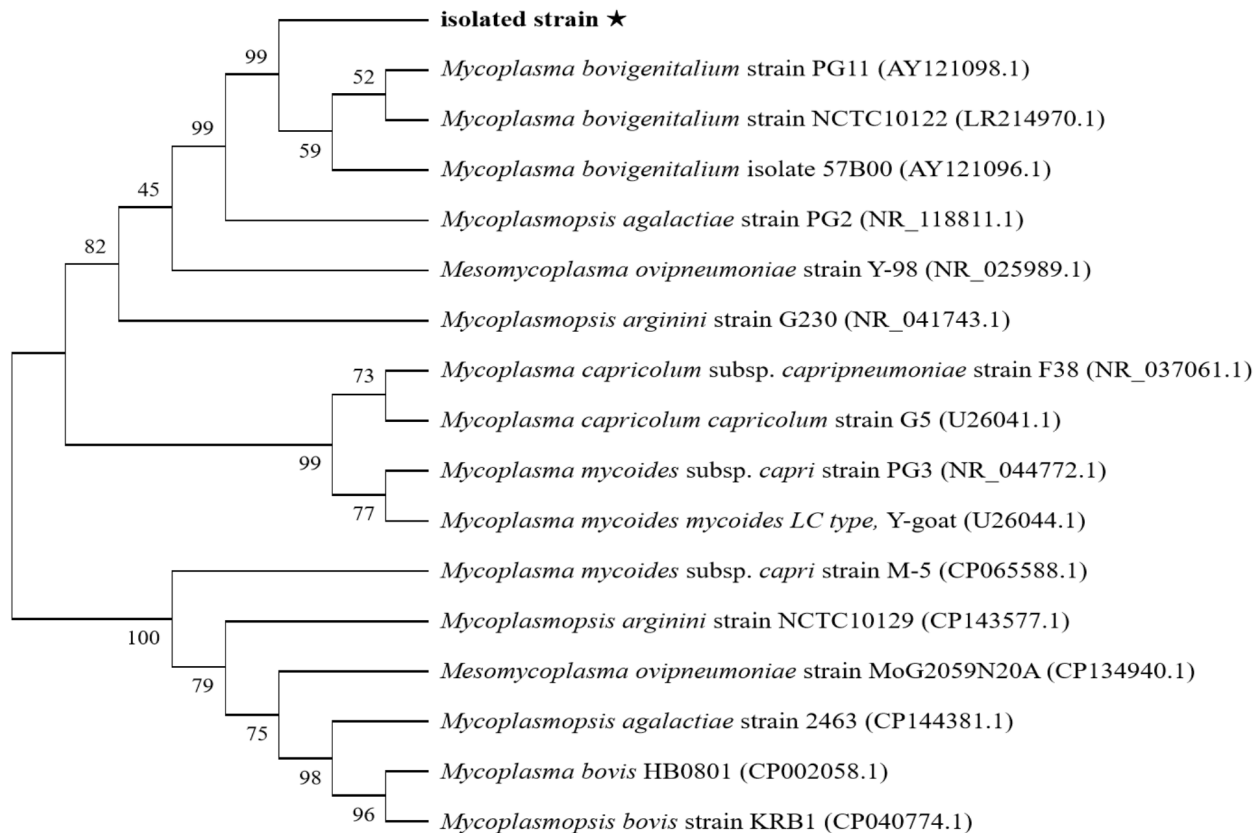


图5 分离菌株与其他支原体的16S rRNA系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene of the isolated strain and other *Mycoplasmas*

3 结论与讨论

在绵羊养殖中,支原体感染已成为危害羊群健康的重要疫病之一,常引发传染性胸膜肺炎、支气管肺炎等呼吸系统疾病。感染的绵羊临床表现为持续性咳嗽、厌食、生长缓慢等,影响绵羊的生长发育和生产性能,导致饲料转化率下降,给养殖场带来严重的经济损失。

本研究旨在探究疑似绵羊肺炎样本中是否存在支原体感染,并明确感染的支原体种类。我们在山西某养殖场选取8只疑似患有肺炎的绵羊,采集鼻拭子和咽拭子样本进行研究。PCR检测结果显示,8只绵羊均存在支原体感染,其中,3只存在Mo感染。在绵羊肺炎的众多致病支原体中,Mo一直被认为是主要的病原体^[10]。然而,在分离培养环节,尽管对3份Mo阳性样本进行多次培养,却未能分离培养出该支原体,这可能是由于Mo在分离培养过程中存在较大难度。已有研究表明,样

品的运输、保存以及培养条件均会对其分离培养产生影响^[11,14]。Mo在分离培养过程中对培养条件极为苛刻,需要特定的营养成分和适宜的温度、pH值环境。同时,样品采集、运输、保存不当都可能影响其活性,导致分离培养失败。值得注意的是,在后续的分​​离培养过程中,我们从1份PCR检测为Mo阳性的咽拭子样本中,成功分离出1株牛生殖支原体。综合PCR鉴定和分离培养结果,可以推断出疑似肺炎的绵羊样本中存在支原体感染,而且存在Mo和牛生殖支原体混合感染的情况。

牛生殖支原体长期以来被认为是一种栖息在牛生殖器官中的共生微生物^[10,15],其研究主要围绕生殖疾病开展。研究人员从牛的包皮黏液、阴道拭子、精液、牛奶等生殖相关材料样品中均分离鉴定到该支原体,证实其在牛生殖系统中广泛分布^[16-20]。且已有研究证明,牛生殖支原体与阴道炎、子宫内膜炎以及不孕症等疾病存在显著关

联^[21-23]。近年来,研究人员发现,除了生殖道致病特性外,牛生殖支原体在呼吸道感染中也扮演着重要角色。例如,HASHEM等^[24]为调查牛呼吸道疾病中病原体的流行情况,从埃及60头出现呼吸道症状(如咳嗽、发热、肺音异常等)的患病犊牛采集鼻咽拭子,利用PPLO培养基进行病原体分离培养,并对获得的培养物进行了测序,结果显示,所有的样本均为混合感染,其中牛生殖支原体的检出率为5%(3例/60例),低于牛支原体的8.33%,与金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和多杀性巴氏杆菌检出率相同,这一发现不仅证实了患有呼吸道疾病的牛呼吸道中存在牛生殖支原体,还揭示了其与牛支原体等病原菌的共感染模式。此外,GOURLAY等^[25]将牛生殖支原体接种于无菌犊牛的气管内进行试验,结果表明,该支原体能够定植于牛的呼吸道,并诱发肺部病变,导致发生肺炎。

长期以来,牛生殖支原体一致被认为主要寄生于牛属动物,但近年来的研究发现,其具有跨物种感染的潜在能力。研究人员从南非患有溃疡性外阴炎的杜泊绵羊的生殖道样本和土耳其卡尔斯地区患有肺炎的羊的肺样本中,均成功分离出牛生殖支原体^[10,26]。此外,BALL^[27]将12株牛生殖支原体接种到羊乳腺中进行试验,结果引起了感染,并产生了致病性效应,其中4株支原体的感染最终转变为亚临床状态,伴有间歇性支原体排泄和低乳细胞水平。这一结果不仅明确了牛生殖支原体对绵羊的致病性,更为其在羊群中的隐性传播风险提供了试验依据。本研究也从山西疑似肺炎的绵羊咽拭子中分离出该支原体,证实了该病原体在我国羊养殖群体中的存在。

人们通常认为,大多数支原体由于缺乏完整代谢途径,高度依赖宿主细胞提供营养,这一特性需要与宿主建立紧密的联系,因而具有极强的宿主特异性。随着研究的深入,越来越多的证据表明,包括牛支原体、无乳支原体、丝状支原体丝状亚种SC型和LC型(*M. mycoides* subsp. *mycoides* SC and LC)在内的一些支原体具有更广泛的宿主范围,可以在绵羊、山羊和牛之间传播^[9,28]。目前的研究表明,牛生殖支原体不仅与牛的生殖道和呼吸道疾病相关,也能感染羊,但在绵羊体内的存在及其可能引发的健康问题尚未得到充分的关注。本研究旨在进一步了解绵羊肺炎的病原体,

有助于改进支原体感染的诊断和防控策略。

参考文献:

- [1] RAZIN S, YOGEV D, NAOT Y. Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(4): 1094-1156.
- [2] BOTTINELLI M, SCHNEE C, LEPRI E, et al. Investigation on *Mycoplasma* populations in pneumonic dairy lamb lungs using a DNA microarray assay[J]. Small Ruminant Research, 2017, 147: 96-100.
- [3] 何川川. 羊呼吸系统微生物调查及主要疾病病原分析[D]. 阿拉尔:塔里木大学, 2020.
HE C C. Microbial investigation of respiratory system in sheep and analysis of main disease pathogens[D]. Ala'er: Tarim University, 2020.
- [4] 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): 2561-2567.
- [5] 王雅雯. 规模化羊场肺炎支原体流行病学调查及分离鉴定[D]. 阿拉尔:塔里木大学, 2021.
WANG Y W. Epidemiological investigation and isolation and identification of *Mycoplasma pneumoniae* in large-scale sheep farm[D]. Ala'er: Tarim University, 2021.
- [6] 许健, 储岳峰, 赵萍, 等. 中国部分地区绵羊肺炎支原体的基因多态性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(9): 1295-1301.
XU J, CHU Y F, ZHAO P, et al. Investigation of gene polymorphism on *Mycoplasma ovipneumoniae* isolates from some areas of China[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2011, 42(9): 1295-1301.
- [7] 王华, 杨发龙, 王永, 等. 山羊支原体性肺炎流行病学调查[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(1): 210-214.
WANG H, YANG F L, WANG Y, et al. Epidemiological investigation of caprine *Mycoplasma pneumoniae*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2011, 38(1): 210-214.
- [8] 江锦秀, 林裕胜, 游伟, 等. 福建省羊支原体性肺炎分子流行病学研究[J]. 福建农业学报, 2017, 32(1): 12-16.
JIANG J X, LIN Y S, YOU W, et al. A molecular epidemiological study on *Mycoplasma pneumoniae* of sheep and goats in Fujian[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2017, 32(1): 12-16.
- [9] KUMAR A, VERMA A K, GANGWAR N K, et al. Isolation, characterization and antibiogram of *Mycoplasma bovis* in sheep pneumonia[J]. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 2012, 7(2): 149-157.
- [10] ÖZTÜRKLER O, OTLU S. A phylogenetic analysis of *Mycoplasma* strains circulating in sheep pneumonia in the Kars region of Turkey[J]. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 2020, 44(4): 805-813.
- [11] 白涛. 山西省晋中地区羊支原体肺炎病原的分离鉴定及灭活疫苗的制备[D]. 晋中:山西农业大学, 2022.
BAI T. Isolation and identification of the pathogen of *Mycoplasma ovis* pneumonia in Jinzhong area of Shanxi Province and preparation of inactivated vaccine[D]. Jinzhong: Shanxi

- Agricultural University, 2022.
- [12] 广西壮族自治区市场监督管理局. 山羊支原体肺炎防控技术规范:DB45/T 2198—2020[S]. 南宁:广西壮族自治区市场监督管理局, 2020.
Guangxi Zhuang Autonomous Region Market Supervision Administration. Technical regulations for prevention and control of *Mycoplasma pneumonia* in goats: DB45/T 2198-2020[S]. Nanning: Market Supervision Administration of Guangxi Zhuang Autonomous Region, 2020.
- [13] WEISBURG W G, BARNS S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2):697-703.
- [14] 储岳峰. 我国山羊(接触)传染性胸膜肺炎病原学、流行病学研究及灭活疫苗的研制[D]. 北京:中国农业科学院, 2011.
CHU Y F. Study on etiology and epidemiology of goat contagious pleuropneumonia in China and development of inactivated vaccine[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011.
- [15] HATA E J, NAGAI K, MURAKAMI K. Complete genome sequence of *Mycoplasma bovis* strain HAZ 596 from a bovine vagina in Japan[J]. *Genome Announcements*, 2017, 5(6):e01554.
- [16] CARLI S D, DIAS M E, DA SILVA M E R J, et al. Survey of beef bulls in Brazil to assess their role as source of infectious agents related to cow infertility[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2022, 34(1):54-60.
- [17] HAZELTON M S, MORTON J M, BOSWARD K L, et al. *Mycoplasma* species in vaginas of dairy cows before and after exposure to bulls and their association with conception[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(12):11795-11805.
- [18] 郭福生, 蔡卫端, 朱士盛, 等. 牛精液中支原体的分离与鉴定[J]. *动物检疫*, 1991(1):3.
GUO F S, CAI W D, ZHU S S, et al. Isolation and identification of *Mycoplasma* from bovine semen[J]. *Animal Quarantine*, 1991(1):3.
- [19] GIOIA G, WERNER B, NYDAM D V, et al. Validation of a *Mycoplasma* molecular diagnostic test and distribution of *Mycoplasma* species in bovine milk among New York State dairy farms[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(6):4668-4677.
- [20] MACKIE D P, BALL H J, LOGAN E F. Isolation of *Mycoplasma californicum* from an outbreak of bovine mastitis and the experimental reproduction of the disease[J]. *Veterinary Record*, 1982, 110(25):578-580.
- [21] MANSO-SILVÁN L, TARDY F, BARANOWSKI E, et al. Draft genome sequences of *Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma arginini*, and *Mycoplasma bovis*, three species with equivocal pathogenic status for cattle[J]. *Genome Announcements*, 2013, 1(3):e00348.
- [22] GHANEM M E, HIGUCHI H, TEZUKA E, et al. *Mycoplasma* infection in the uterus of early postpartum dairy cows and its relation to dystocia and endometritis[J]. *Theriogenology*, 2013, 79(1):180-185.
- [23] OSAWA T. Predisposing factors, diagnostic and therapeutic aspects of persistent endometritis in postpartum cows[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2021, 67(5):291-299.
- [24] HASHEM Y M, MOUSA W S, ABDEEN E E, et al. Prevalence and molecular characterization of *Mycoplasma* species, *Pasteurella multocida*, and *Staphylococcus aureus* isolated from calves with respiratory manifestations[J]. *Animals*, 2022, 12(3):312.
- [25] GOURLAY R N, HOWARD C J, THOMAS L H, et al. Pathogenicity of some *Mycoplasma* and *Acholeplasma* species in the lungs of gnotobiotic calves[J]. *Research in Veterinary Science*, 1979, 27(2):233-237.
- [26] KALSHINGI H A, BOSMAN A M, GOUWS J, et al. Molecular characterisation of *Mycoplasma* species isolated from the genital tract of Dorper sheep in South Africa[J]. *Journal of the South African Veterinary Association*, 2015, 86(1):e1-e11.
- [27] BALL H J. Experimental mastitis caused by *Mycoplasma bovis* and *M. canadense* in the ewe[J]. *Veterinary Microbiology*, 1990, 22(4):383-388.
- [28] PITCHER D G, NICHOLAS R A J. *Mycoplasma* host specificity: fact or fiction? [J]. *The Veterinary Journal*, 2005, 170(3):300-306.