

## 肉牛支原体病原分离鉴定及药物敏感性试验

杨 莉<sup>1</sup>, 姜玲玲<sup>1</sup>, 张 涛<sup>1</sup>, 吴位珩<sup>1\*</sup>, 徐景峨<sup>1</sup>, 余 波<sup>1</sup>,  
刘 镜<sup>1</sup>, 杨茂生<sup>1</sup>, 孙启跃<sup>1</sup>, 冯明祥<sup>2</sup>, 刘 和<sup>3</sup>, 邹茂华<sup>4</sup>

(1. 贵州省农科院畜牧兽医研究所,贵州 贵阳 550005;2. 贵州省关岭自治县畜牧服务中心,贵州 关岭 561300;  
3. 思南畜牧技术推广站,贵州 铜仁 565100;4. 黔西县农业农村局,贵州 黔西 551500)

**摘要:**[目的]为调查贵州省肉牛运输综合征主要病因牛支原体,研究无菌采集疑似牛支原体鼻拭子和病死牛肺,进行牛支原体液体培养和固体培养,[方法]采用形态学观察和生化试验鉴定该分离株,进行了组织病理切片观察,用特异性检测牛支原体的 PCR 方法进行检测,并对阳性样本进行药敏试验。[结果]结果显示,从采集到的 163 份疑似样本中,检测出 60 份牛支原体阳性样本,且成功分离到 18 株牛支原体,PCR 检测和同源性结果表明扩增片段为牛支原体的特异性条带,同源性的比对结果为 93.02% ~ 100%。分离株菌落呈典型的“煎蛋样”。组织切片结果可见患病牛肺间质动脉血管充血、肺间质水肿变宽,呈灰白色;肺间质纤维增生,有实质性病变;肺泡上皮细胞变性坏死;肺泡内有大量粘液。因并发或继发其他病原菌感染,其他器官组织也发生了病理变化。分离株牛支原体既不分解葡萄糖、甘露醇、尿素酶、明胶,也不水解精氨酸,酚红葡萄糖肉汤呈阳性反应,七叶苷生化反应为阳性。药敏试验表明:氟苯尼考、诺氟沙星、新霉素、头孢派酮、氧氟沙星高度敏感。[结论]研究结果证实了引起贵州省肉牛运输综合征主要病因是牛支原体,这为贵州省牛支原体病的防治提供了科学依据。

**关键词:**牛支原体; 分离; 鉴定; 药敏试验

**中图分类号:**S823      **文献标识码:**A

**文章编号:**1001-9111(2020)04-0001-06

牛支原体是危害养牛业的一种重要的致病性病原,无细胞壁,介于细胞和病毒之间。致病性支原体除能导致牛肺炎、乳腺炎、关节炎外,还导致眼结膜炎、耳炎、生殖道炎症与不孕等多种疾病<sup>[1]</sup>。1961 年,美国人 Hale<sup>[2]</sup>首次从患乳腺炎的牛乳中分离得到牛支原体,该病原在世界范围内普遍存在。自 2008 年以来,我国大部分省(地区)从外地引入肉牛爆发了以坏死性肺炎为主要特征的“传染性牛支原体肺炎”疫情,多数牛在运输到目的地后 1~2 周发病,发病率为 20% ~ 100%,病死率高达 10% ~ 50%,给我国内肉牛养殖业造成了巨大的经济损失<sup>[3]</sup>。随着贵州扶贫攻坚的开展,肉牛引进量不断增大,带来了一系列流行病的感染、发生,肉牛运输

综合征最为突出,而牛支原体病是引起牛运输综合征的主要病因,给贵州省养牛业造成巨大经济的损失,为此项目组对牛支原体病在贵州省的流行情况进行调查,并对牛支原体病原进行分离鉴定、生物学特性、分子诊断及药物敏感性研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材 料

1.1.1 试验样本 无菌采集疑似感染牛支原体病牛的鼻拭子和病死牛肺。

1.1.2 参考菌株 牛支原体菌株由华中农业大学动物医学院惠赠。

1.1.3 引物 引物序列为:上引物,5' - ACGT-

收稿日期:2029-03-15 修回日期:2020-03-20

基金项目:贵州省农业攻关计划项目“肉牛支原体病防控关键技术研究”(黔科合支撑[2016]2503 号);贵州省现代肉牛产业技术体系建设项目(GZCYTX-0301);贵州省肉牛养殖工程技术研究中心建设项目(黔科合平台人才[2016]5201 号);贵州省科学科技重点项目“贵州优质专用肉牛品种选育”(黔科合 NY[2015]3002 号)

作者简介:杨莉(1975—),女,贵州习水人,副研究员,本科,主要从事兽医微生物研究。E-mail:937476015@qq.com

\* 通讯作者:吴位珩(1966—),女,侗族,研究员,主要从事畜禽疾病研究。E-mail:497432236@qq.com

GACTACTTCACCCCTGAT - 3'; 下引物, 5' - TAGAC-CCACTATTTCACCTTC - 3', 由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.1.4 生化试剂 PPLO 肉汤培养基、PPLO 固体培养基(青岛高科技工业园, 海博生物技术有限公司); 特级马血清、酵母粉、精氨酸(北京索莱宝科技有限公司); Lab-Aid 820 核酸提取 Mini 试剂盒(厦门致善生物科技股份有限公司); Goldview 核酸染料、蛋白酶 K、十二烷基硫酸钠、EDTA、Tris-HCl、琼脂糖、DL2000 Marker、2 × TaqPCR MasterMix (10 mmol/L Tris-HCl、50 mmol/L KCl、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.05 U Poymerase/μL)、去离子水(天根生化科技[北京]有限公司); 细菌微量生化鉴定管(青岛高科技工业园, 海博生物技术有限公司); 药敏试纸(杭州滨和微生物试剂有限公司)。

1.1.5 主要仪器 石蜡切片机(Leica RM2125, 德国); 高通量快速研磨仪(海净信实业发展有限公司); Lab-Aid 820 核酸提取仪(厦门百维信生物科技有限公司); 电子天平(美国奥豪斯 AR2140); 高速冷冻离心机(美国赛麦飞 SORVALL; LEGEND MICRO 21R); 梯度 PCR 扩增仪、电泳仪、紫外透射仪、凝胶成像仪(德国 BIOMETRA); 紫外分光光度计: 北京普析(TU-1810SPC)。

## 1.2 方法

1.2.1 样本采集 2018 年采自黔西县牛场患病牛的鼻拭子和死亡牛肺。无菌采集疑似牛支原体肺炎病死牛肺, 或采用棉签采集疑似牛支原体肺炎鼻涕(鼻拭子), 用冷藏箱带到实验室, 冷藏备用。

1.2.2 组织样本固定 将病死牛肺用生理盐水清洗后, 置 10% 的甲醛溶液中固定, 待进行组织病理切片的制备。

1.2.3 病原分离培养 鼻拭子分离培养: 取 1 mL 生理盐水将鼻拭子浸润, 尽量将药棉棒上的鼻涕清洗在试管里, 弃去药棉棒, 采用孔径为 0.45 μm 滤膜过滤上述溶液后接种于 PPLO 肉汤培养基中, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温分别培养 24, 48, 72 h, 观察培养基的颜色及培养液絮状物的变化情况, 如果由红变黄, 有絮状物出现, 转接于 PPLO 固体培养基中, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养 48 h 以上, 同时取 1 mL 培养液置于 1.5 mL 的离心管中, 以备提取病原菌 DNA。

病死牛肺分离培养: 采用生理盐水将采集到的牛肺冲洗, 将肺置于平皿中, 用手术剪刀取中间没有污染部分, 进行组织研磨, 采用孔径为 0.45 μm 滤膜过滤后接种于 PPLO 肉汤培养基中, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养 24, 48, 72 h, 观察培养基的颜色及培养

液絮状物的变化情况, 如果由红变黄, 有絮状物出现, 可转接于 PPLO 固体培养基中, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养 48 h 以上, 同时取 1 mL 培养液置于 1.5 mL 离心管中, 以备提取病原菌 DNA。

1.2.4 组织病理切片制备 将置 10% 的甲醛溶液中固定 1 周的肺、组织, 进行酒精脱水和二甲苯透明, 脱水时间从低浓度到高浓度(见表 1), 接着让石蜡充分渗入到肺组织中, 使组织结实, 有利于连续切片。然后进行常规切片, 染色, 并在显微镜下观察, 记录组织结构变化。

表 1 肺组织脱水步骤

试剂	脱水时间/h	透明时间/h
75% 酒精浓度	1.5	
85% 酒精浓度	1.5	
95% 酒精浓度	1.5	
无水酒精 I	1.5	
无水酒精 II	1.5	
二甲苯 I		0.25
二甲苯 II		0.25

1.2.5 生化反应试验 按常规操作将分离的 16 株菌株(HZ 株、25025 株、J89310、J7、J9、J23、J31、J39、J40、J41、W25、W28、W44、W69、W77、W88), 接种于细菌微量生化鉴定管中(购自青岛海博生物技术有限公司), 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养 48 ~ 72 h, 观察结果并记录。

1.2.6 PCR 检测与鉴定 组织样本肺 DNA 提取: 取样本肺少许, 采用高通量快速研磨仪研磨, 加入 900 μL 生理盐水, 反复冻融 3 次, 然后 5 000 r/min 离心 5 min, 取 700 ~ 900 μL 上清液, 加入 20 μL 蛋白酶 K, 100 μL 10% SDS 液, 55 °C 水浴箱中加热 30 min 至组织消化完全, 取出冷却。采用核酸提取 Mini 试剂盒提取所需 DNA 模板。

样本鼻拭子 DNA 提取: 用 1 mL ddH<sub>2</sub>O 将鼻拭子完全浸润, 尽量将药棉棒上的鼻涕清洗在试管里, 弃去药棉棒, 将试管里的溶液全部移入 1.5 mL 的离心管中, 10 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 收集沉淀。采用核酸提取 Mini 试剂盒提取所需 DNA 模板。

分离培养菌株 DNA 提取: 取培养菌液 1 500 μL 于 2 mL 的离心管中, 10 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 收集沉淀。采用核酸提取 Mini 试剂盒提取所需 DNA 模板。

PCR 扩增条件: 采用提取的 DNA 模板, 利用合成的引物在 PCR 酶的作用下进行扩增。反应体系和条件: PCR 酶为 10 μL, 支原体标准菌株 DNA 模板 2 μL, 样本 DNA 模板 2 μL, 上下引物各 1 μL, 加入

ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL, 在 Tgradient96 扩增仪下进行如此循环: 94 °C 变性 5 min, 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。反应结束后将扩增产物取 5 μL 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

**PCR 产物鉴定:** 牛肺炎支原体的 PCR 扩增片段经胶回收, 送上海生工宝生物工程有限公司测序, 并将测序结果在 NCBI 中进行病原菌的鉴定和同源性的比对。

**1.2.7 药物敏感性试验** 分别将分离到的菌株采用消毒过的药棉棒, 蘸取 100 μL 菌液, 均匀地涂布于 PPLO 固体培养基上, 再将药敏试纸置于均匀涂布有菌液的固体培养基上, 每个培养基一般放置 7~9 张药敏试纸, 然后 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养 1~2 d, 观察并记录抑菌圈直径的大小, 并判断药物的敏感性。

## 2 结果与分析

### 2.1 发病牛临床症状

发病牛临床症状主要表现为体温升高、精神沉郁、食欲减退、被毛粗乱、咳嗽、气喘、流黏性或脓性鼻液、拉稀、血便、关节炎、结膜炎、极度消瘦, 甚至衰竭死亡。解剖后死亡牛肺部有干酪样坏死灶或化脓性坏死灶, 胸腔内有大量纤维性渗出液或脓性液体, 有些出现肺与胸腔粘连, 以及消化道溃疡等。

### 2.2 病原菌的分离培养结果

2018 年 6 月, 项目组自黔西隔离场采集引进能繁母牛疑似病牛鼻拭子样本 163 份, 死亡牛肺样本 1 份, 检测出 60 份牛支原体阳性样本, 分离培养出 18 株形态特征和生长特性与牛支原体相符的菌株。分离的菌在 PPLO 液体培养基中培养 72 h 后, 液体 PPLO 培养液开始变色; 分离传代培养时, 液体变色时间缩短, 只需要 24 h 就可由红变黄。在 PPLO 固体培养基上培养 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养 72 h 后, 可见针头大小不一的菌落(图 1), 在普通光学显微镜下可看到菌落呈圆形, 边缘整齐, 具有典型的“油煎蛋”状菌落(图 2)。



图 1 PPLO 固体培养基上针头大小不一的菌落

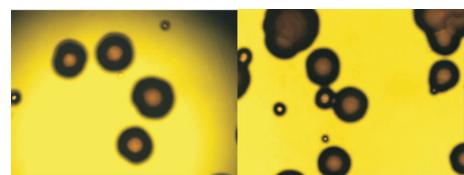
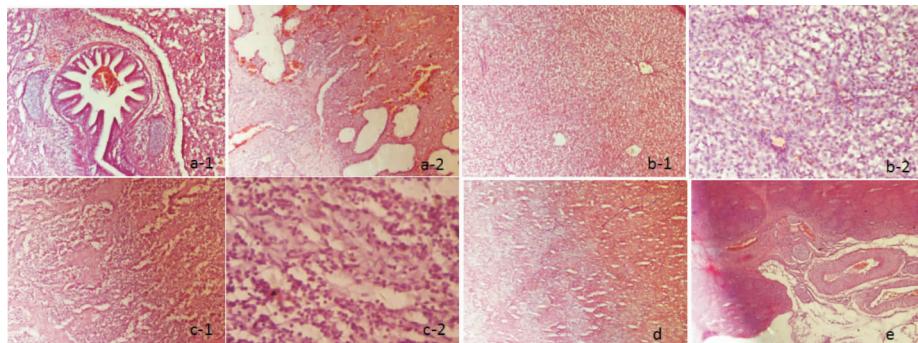


图 2 显微摄影下典型的“油煎蛋状”形态(40×)

### 2.3 组织病理切片结果

牛患支原体肺炎后, 往往并发其他病原菌感染, 使病牛病情加重, 甚至造成死亡, 因此不仅仅肺部发生病理变化, 其他器官也随着病情的变化发生病变, 具体的病理变化由图 3(a-1 和 a-2)肺组织病理切片结果可见, 肺间质动脉血管充血、肺间质水肿变宽, 呈灰白色; 肺间质纤维增生, 有实质性病变; 肺泡上皮细胞变性坏死; 肺泡内有大量粘液。由图 3(b-1 和 b-2)肝组织病理切片结果可见, 肝小叶中央静脉瘀血, 间质中央动脉充血, 肝上皮细胞脂肪变性和颗粒变性; 间质中炎症细胞增生。由图 3(c-1 和 c-2)淋巴组织病理切片结果可见, 牛淋巴结皮质和髓质结构不清, 髓质间水肿, 淋巴小结的生发中心淋巴细胞活化, 淋巴细胞增生。由图 3(d)的心组织病理切片结果可见, 牛心肌颗粒变性, 肌纤维之间水肿。由图 3(e)脾组织病理切片可见, 牛脾脏白髓内淋巴小结活化, 淋巴细胞增生, 红髓内淋巴细胞增生, 脾索之间水肿。



注:a-1 和 a-2 为肺组织;b-1 和 b-2 为肝组织;c-1 和 c-2 为淋巴组织;d 为心组织;e 为脾组织。

图 3 不同组织病理切片结果

## 2.4 生化试验结果

常规操作将分离的菌株接种于细菌微量生化鉴定管中,由结果(表 2)可知:所有菌株对酚红葡萄糖肉汤、七叶昔呈阳性反应,对明胶、L-精氨酸双水

解酶、尿素酶呈阴性反应;HZ、J23 和 W44 葡萄糖发酵管为阳性,其余菌株呈阴性反应;菌株 25025、J41 和 W69 甘露醇反应呈阳性,其余菌株为阴性反应。

表 2 牛支原体生化反应试验

菌株	酚红葡萄糖肉汤	葡萄糖发酵管	七叶昔	明胶	L-精氨酸双水解酶	尿素酶	甘露醇
HZ	+ ,变黄	+	+	-	-	-	-
25025	+ ,变黄	-	+	-	-	-	+
J89310	+ ,变黄	-	+	-	-	-	-
J7	+ ,变黄	-	+	-	-	-	-
J9	+ ,变黄	-	+	-	-	-	-
J23	+ ,变黄	+	+	-	-	-	-
J31	+ ,变黄	-	+	-	-	-	-
J39	+ ,变黄	-	+	-	-	-	-
J40	+ ,变黄	-	+	-	-	-	-
J41	+ ,变黄	-	+	-	-	-	+
W25	+ ,变黄	-	+	-	-	-	-
W28	+ ,变黄	-	+	-	-	-	-
W44	+ ,变黄	+	+	-	-	-	-
W69	+ ,变黄	-	+	-	-	-	+
W77	+ ,变黄	-	+	-	-	-	-
W88	+ ,变黄	-	+	-	-	-	-

注: + 表示反应, - 表示不反应。

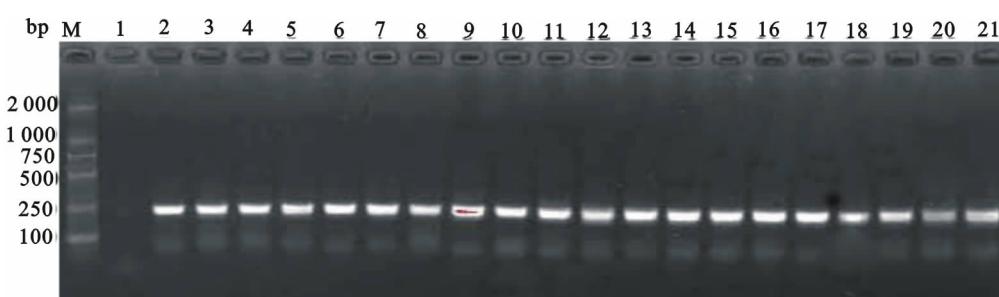
## 2.5 样本及分离菌株的 PCR 检测结果

对 2018 年采自牛场样本 163 份牛鼻拭子和肺进行 PCR 检测,同时进行细菌学分离培养。结果共检测出阳性样本 60 份,且与细菌学检验结果一致如图 4 所示。同时将 PCR 扩增片段经胶回收,送上海生工宝生物工程有限公司测序,并将测序结果在 NCBI 中进行病原菌的鉴定和同源性的比对。结果

表明,扩增片段为牛支原体的特异性条带,同源性的比对结果为 93.02% ~ 100%。

## 2.6 药物敏感性试验结果

通过将药敏试纸置于均匀涂布有菌液的固体培养基上,经 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养 1~2 d,观察并记录抑菌圈直径的大小,结果如表 3 所示。



注:M 为 Marker DL2000;1 为阴性对照;2 为标准阳性;3~21 为被检出的阳性样本。

图 4 样本及分离菌株的 PCR 检测结果

表3 药物抑菌圈直径大小的记录

mm

药敏 纸片	菌株																	
	HZ	25025	J89310	J7	J9	J23	J31	J39	J40	J41	J83	W25	W28	W44	W69	W77	W88	W31
氟苯尼考	12	20	17	20	21	23	14	20	22	25	20	15	10	22	25	20	22	16
诺氟沙星	-	27	1	30	30	28	-	25	27	26	26	18	-	27	28	25	28	25
新霉素	13	21	14	22	21	22	13	20	18	22	23	22	11	21	22	20	22	20
头孢哌酮	18	15	20	25	25	26	16	16	25	11	15	16	16	22	20	11	26	13
氧氟沙星	-	30	1	27	30	26	-	27	26	30	30	30	-	26	30	25	29	25
卡拉霉素	10	20	1	20	20	21	14	20	20	20	21	20	15	21	17	20	21	8
呋喃妥英	16	20	20	15	17	17	15	17	16	16	19	10	15	10	25	18	19	13
呋喃唑酮	15	18	20	20	20	20	14	20	20	19	20	20	16	12	15	18	15	-
链霉素	-	-	12	19	1	20	1	18	20	19	18	20	15	20	16	18	-	16
头孢曲松	-	-	-	20	20	20	16	1	20	-	-	1	15	25	18	-	30	-
强力霉素	-	22	-	-	11	12	-	10	12	11	11	10	-	14	15	10	10	8
头孢噻肟	-	-	1	-	20	20	16	1	20	-	-	1	15	25	15	-	29	-
四环素	-	15	-	15	16	15	-	13	15	15	15	11	-	15	17	13	15	15
甲氧喳啶	-	-	-	-	22	-	-	20	15	23	22	15	-	15	-	15	-	26
利福平	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-
头孢西丁	-	-	-	-	-	-	18	-	-	-	-	-	-	15	-	-	17	-
氨苄西林	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-
青霉素 G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
林可霉素	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
头孢呋辛	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	-
阿莫西林	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-
头孢唑林	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	-

### 3 结论与讨论

牛支原体病在国外是一个常见病,但是在我国一直没有引起足够重视。国内牛群发病基本上按照牛胸膜肺炎疫情进行防治,误判病情而忽略了基本的防护常识,按照牛胸膜肺炎进行药物治疗,无法有效地保护发病牛群,不仅仅造成药物浪费,同时造成发病牛死亡,带来巨大经济损失。据报道<sup>[4]</sup>,临床健康犊牛购入24 h后,鼻腔中可检出牛支原体,但大部分牛7 d后经鼻腔可检牛支原体。金云云等研究认为,多数牛在运达目的地后2周左右发病,不良环境下如途中遭雨淋等,牛可在运达目的地后第2天即发病。感染牛支原体的牛可携带病原体数月甚至数年而成为一个传染源,主要传播途径是通过飞沫呼吸道传播,近距离接触、吮吸乳汁或生殖道接触等也可传播牛支原体。

随着扶贫工作的深入开展,养牛产业成为了贵州省多地脱贫攻坚的主导产业及重要抓手。肉牛引进量不断增大,带来了一系列流行病发生和感染问题,肉牛支原体病就是主要疾病。因而笔者对牛支原体病在贵州省的发生、流行情况进行了调查,并对牛支原体病原进行了分离鉴定、生物学特性、分子诊断和药物敏感性等方面的研究工作。研究表明:牛

支原体在分类上属于支原体属,该病原具有体型微小、基因组分微量等显著特点<sup>[6]</sup>。支原体的培养基除基础营养物质外,尚需要丰富的血清蛋白、胆固醇和酵母浸液,血清主要提供胆固醇、脂肪酸和蛋白质,酵母浸液提供核苷前体、维生素及刺激生长的某些成分,牛支原体在pH 7.0~8.0范围内生长良好,在一定的CO<sub>2</sub>(5%~10%)环境、湿度(60%~80%)、温度(36~37℃)条件下生长较好,培养2~3 d,在低倍镜下观察琼脂培养基上长出“煎蛋样”菌落。牛患支原体肺炎后,往往并发或继发其他病原菌感染,而使病牛病情加重,因此不仅仅肺部发生病理变化,其他器官也随着病情的变化发生病变,甚至造成死亡。牛支原体既不分解葡萄糖、甘露醇、尿素酶、明胶,也不水解精氨酸,酚红葡萄糖肉汤呈阳性反应,接种菌株后,放置37℃厌氧培养24 h,培养基由红色变为黄色,七叶苷生化反应为阳性,符合牛支原体的生化特征。分离菌株的PCR检测及测序结果表明:扩增片段为牛支原体的特异性条带,在NC-BI同源性的比对结果为93.02%~100%,这说明牛支原体是牛场重要的病原菌之一。由于引起呼吸道疾病的病因复杂,有必要进一步对其他病原菌(如病毒、细菌等)进行调查,以便更加全面地了解牛场的混合感染情况。抗生素治疗是控制和治疗牛支原

体病的主要手段。由于支原体结构和功能的特点使其对β-内酰胺类抗菌药和磺胺类药物具有内在的抗性,但是对影响蛋白质或核酸合成的抗生素敏感<sup>[7]</sup>。近年来,牛支原体耐药的报道逐渐增多,从比利时、德国和意大利3个国家分离的牛支原体对替米考星、泰乐菌素等常用药具有严重的耐药性<sup>[8]</sup>。张利等<sup>[9]</sup>研究表明,牛支原体对恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星等药物的抵抗性增强。马艳君等<sup>[10]</sup>研究表明,牛支原体对恩诺沙星和头孢噻呋有耐药。本试验对分离的支原体进行了药物敏感性试验,结果表明对氟苯尼考、诺氟沙星、新霉素、头孢派酮、氧氟沙星高度敏感;对卡拉霉素、呋喃妥英、呋喃唑酮、连霉素中度敏感;对头孢曲松、强力霉素、头孢噻肟、四环素、甲氧嘧啶低度敏感;对利福平、头孢西丁、氨苄西林、青霉素G、林可霉素、头孢呋辛、阿莫西林、头孢唑林不敏感。这一结果对牛场支原体疾病的发生、流行及防治起到了积极的指导作用。

#### 参考文献:

- [1] NICHOLAS R A, AYLING R D. *Mycoplasma bovis*: Disease, di- agnosis and control[J]. Res. Vet. Sci., 2003, 74(2):105-112.
- [2] THOMAS A, DIZIER I, LINDEN A, et al. Conservation of the uvrC gene sequence in *Mycoplasma bovis* and its use in routine PCR diagnosis[J]. Vet. J., 2004, 168(1):100-102.
- [3] 石磊, 龚瑞, 尹争艳, 等. 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, 27(5):629-633.
- [4] 胡长敏, 郭爱珍. 牛支原体病的流行特点与防控措施[J]. 兽医导刊, 2011(11):41-43.
- [5] 金云云, 刁根强, 王静梅, 等. 牛支原体间接ELISA检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2014, 46(2):10.
- [6] WISS K S, CALCUTT M L, FOECKING M F, et al. Complete genome sequence of *Mycoplasma bovis* type strain PG45 (ATCC 25523)[J]. Infect. Immun., 2011, 79(2):982-983.
- [7] MAUNSELL F P, WOOLMS A R, FRANCOZ D, et al. *Mycoplasma bovis* infections in cattle[J]. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2011, 25(4):772-783.
- [8] 刘超, BARBERIO A, FLAMINIO B, 等. 国外奶牛场牛支原体体外药敏试验报告[J]. 中国乳业, 2017(3):52-55.
- [9] 张利, 李玉平, 黎晓敏, 等. 牛支原体药物敏感性试验[J]. 动物医学进展, 2012, 33(2):110-113.
- [10] 马艳君, 阿比克哈莫, 汤承, 等. 牛支原体的分离鉴定及药敏试验分析[J]. 四川畜牧兽医, 2018, 33(3):30-32.

## Isolation, Identification and Drug Sensitivity Test to *Mycoplasma bovis*

YANG Li<sup>1</sup>, JIANG Ling-ling<sup>1</sup>, ZHANG Tao<sup>1</sup>, WU Wei-heng<sup>1\*</sup>, XU Jing-e<sup>1</sup>, YU Bo<sup>1</sup>, LIU Jing<sup>1</sup>, YANG Mao-sheng<sup>1</sup>, SUN Qi-yue<sup>1</sup>, FENG Ming-xiang<sup>2</sup>, LIU He<sup>3</sup>, ZOU Mao-hua<sup>4</sup>

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang, Guizhou 550005;  
 2. Animal Husbandry Service Center of Guanling Autonomous County, Guanling, Guizhou 561300;  
 3. Sinan Animal Husbandry Technology Promotion Station, Tongren, Guizhou 565100;  
 4. Bureau of Agriculture and Rural Affairs of Qianxi County, Qianxi, Guizhou 551500)

**Abstract:** [Objective] To investigate the main cause of transport syndrome of beef cattle in Guizhou, [Method] the samples from nose swabs and dead cattle's lung with suspected infective *Mycoplasma bovis* were collected and isolated with solid and liquid medium. After morphological observation and biochemical test to identify the isolated strains, the histopathologic slice observation, specific PCR, and drug sensitive tests to these samples were carried out for detection to *Mycoplasma bovis*. [Result] The results showed that 60 out of 163 suspected samples collected were detected positive, and 18 strains were successfully isolated. PCR detection and homology results showed that the amplified fragment had a specific band of *Mycoplasma bovis*, and the homology comparison results were 93.02% ~ 100%. The isolated colony showed typical "fried egg" appearance. Tissue biopsy results showed the diseased cattle pulmonary interstitial was artery congestion, pulmonary interstitial edema became widened and gray-white, and pulmonary interstitial fiber hyperplasia with substantial lesions. Additionally, the alveolar epithelial cell occurred degeneration and necrosis and a large amount of mucus were in the alveoli. Due to the complication or secondary infection of other pathogenic bacteria, pathological changes also occurred in other organs and tissues. Neither glucose, mannitol, urease, gelatin, nor arginine was hydrolyzed by the isolated *Mycoplasma bovis*. Both Phenolic red glucose broth and the biochemical reaction of esculin was positive. The drug sensitivity test showed that fluorphenicol, norfloxacin, neomycin, cefoperazone and ofloxacin were highly sensitive. [Conclusion] The results of this study confirmed that the main cause of beef cattle transport syndrome was *Mycoplasma bovis*, which provided a scientific basis for the prevention and treatment of *Mycoplasma bovis* disease.

**Key words:** *Mycoplasma bovis*; separation; authenticate; drug sensitivity test