



研究报告

一株源自孔雀的新型支原体的鉴定及其致病性和基因组分析

刘星丽¹ 徐怀英^{*2} 仇伟³ 黄迪海⁴ 秦春芝⁴ 郭卉⁴ 秦卓明^{*1,2,4}

1 山东师范大学生命科学学院 山东 济南 250014

2 山东省农业科学院家禽研究所 山东 济南 250100

3 济南动物园服务中心 山东 济南 250031

4 山东省健牧生物药业有限公司 山东 济南 250100

摘要:【背景】*Mycoplasma gallinaceum* (MGC)是禽源支原体的一种,仅在南非、英国等地发生,我国鲜有报道。【目的】从患呼吸道病的孔雀气管中分离到一株支原体,命名为 Peacock20181011,确定其分类、致病性和基因组特征。【方法】利用微生物学常规方法,结合分子生物学检测和基因组序列,对其进行鉴定;通过对 Special pathogenic free (SPF)鸡、鸡胚的致病性研究和最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)测定,确定其致病性和药敏性。【结果】通过对分离菌的培养、纯化、形态学和染色观察,结合生化试验和 16S rRNA 基因测序证实,该菌为一株新的 MGC,与模式菌株 NCTC10183 的 16S rRNA 基因相似性高达 99.86%,系统发育树显示该菌与 MGC 属同一分支;人工感染实验表明该菌对 SPF 鸡无致病性,但可造成 SPF 鸡胚发育迟缓,爪部蜷缩;MIC 结果显示该菌对单硫酸卡那霉素和氟苯尼考等敏感。基因组序列表明,该菌基因组长度为 1 183 913 bp, (G+C)mol% 含量为 28.7%,含有 898 个 Coding sequences (CDS),拥有 4 个拷贝的 16S rRNA 基因和 6 个质粒,预测有 20 个毒力因子基因和 2 个耐药基因。【结论】明确了 MGC 在我国的存在,丰富了中国禽源支原体的种类,为支原体病的防控提供了依据。

关键词: 孔雀, 支原体, 鉴定, 致病性, 基因组

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500800); Key Research and Development Program of Shandong Province (2018GNC110020); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2017MC038)

***Corresponding authors:** E-mail: XU Huai-Ying: hyingxu@163.com; QIN Zhuo-Ming: qinzm1997@163.com

Received: 20-09-2019; **Accepted:** 09-12-2019; **Published online:** 02-01-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500800); 山东省重点研发计划(2018GNC110020); 山东省自然科学基金(ZR2017MC038)

***通信作者:** E-mail: 徐怀英: hyingxu@163.com; 秦卓明: qinzm1997@163.com

收稿日期: 2019-09-20; **接受日期:** 2019-12-09; **网络首发日期:** 2020-01-02

Identification, pathogenicity and genome analysis of a new mycoplasma from peacock

LIU Xing-Li¹ XU Huai-Ying^{*2} ZHANG Wei³ HUANG Di-Hai⁴ QIN Chun-Zhi⁴
GUO Hui⁴ QIN Zhuo-Ming^{*1,2,4}

1 College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan, Shandong 250014, China

2 Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong 250100, China

3 Jinan Zoo Service Center, Jinan, Shandong 250031, China

4 Shandong Jianmu Biological Pharmaceutical Company Limited, Jinan, Shandong 250100, China

Abstract: **[Background]** *Mycoplasma gallinaceum* is a kind of mycoplasma in poultry, which occurs only in South Africa and other places, but rarely reported in China. **[Objective]** A mycoplasma strain was isolated from the trachea of peacock with respiratory tract disease and named Peacock20181011, to determine its taxonomic status, pathogenicity and molecular characteristics. **[Methods]** The newly isolated pathogenic bacterium was identified by routine microbial methods, combined with molecular biological methods and full-length genome sequences. The pathogenicity and drug sensitivity of the newly isolated pathogens were determined by pathogenicity in special pathogenic free chickens, embryos and minimal inhibitory concentration test. **[Results]** Through the culture, purification, morphology and staining observation of isolates, combined with biochemical tests and 16S rRNA gene sequencing, it was confirmed that Peacock20181011 belonged to *Mycoplasma gallinaceum*, and the 16S rRNA gene similarity to that of standard strain NCTC10183 (LR214950) was up to 99.86%, and the phylogenetic tree showed that Peacock20181011 was in the same branch of *Mycoplasma gallinaceum*; Artificial infection experiment showed that the fungus was not pathogenic to special pathogenic free chicken, but could cause special pathogenic free chicken embryos to develop late and the claw was curled up; minimal inhibitory concentration test showed that the bacterium was sensitive to kanamycin and florfenicol. The analysis of genome sequence showed that the bacterial length was 1 183 913 bp and the content of (G+C)mol% was 28.7%, which contained 898 coding sequences with four copies of 16S rRNA gene. **[Conclusion]** The existence of *Mycoplasma gallinaceum* in China is defined, the species of Mycoplasma in China are enriched, and the basis for prevention and control of the disease is provided.

Keywords: Peacock, Mycoplasma, Identification, Pathogenicity, Genome

支原体病是禽类的重要疾病之一, 主要由鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*, MG)、滑液囊支原体(*Mycoplasma synoviae*, MS)、衣阿华支原体(*Mycoplasma iowae*, MI)等支原体引起, 临床症状表现为呼吸困难、打喷嚏、生长迟缓及产蛋率下降等, 可造成严重的经济损失^[1-2]。我国大多数禽类均存在多种支原体的潜伏感染, 但较少致病。支原体一旦发病, 常常会导致长期、慢性感染, 临床出现病程长、易反复和难治愈等特点。温度忽高忽低、温差大、氨气浓度高和通风不良等应激均可导致该病的发生, 且易与大肠杆菌、新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)和传染

性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)等病原混合感染, 进而加重病情^[3-4]。

Mycoplasma gallinaceum (MGC)属于柔膜体纲支原体目支原体科支原体属, (G+C)mol%含量为28%, 模式菌株为NCTC 10183株(GenBank 登录号LR214950), 基因组全长1 074 838 bp, 代谢能力差, 营寄生生活^[5]。MGC较早分离于南非, 通常可以从感染病鸡的上呼吸道或输卵管中获得, 一般被认为是非致病性支原体^[6]。Adeyemi等发现, MGC可增强IBV在感染鸡气管中复制的能力, 加重了IBV对家禽机体的危害^[7]。Beylefeld等证实, MGC分离株对金霉素、泰乐菌素和土霉素具有多

重耐药性^[8]。中国是一个禽类养殖大国,但对于禽源支原体的研究主要集中于 MG 和 MS,而对于其他类型的支原体研究较少。

2018 年 10 月,从久治不愈、呼吸困难的发病孔雀气管粘液中分离获得一株支原体,经分子测序证实为隶属于 MGC 种的一个新菌株,并对其病原学、致病性和药敏性以及基因组进行研究,以期为临床禽类支原体病的防控提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料来源

2018 年秋,山东省济南某动物园约 40 只孔雀出现呼吸困难、眼睛流泪、流鼻液等病症,注射庆大霉素、青霉素等多种药物效果不佳。治疗 1 周无果后送山东省农业科学院家禽研究所进行诊断。剖检可见,病孔雀喉头和气管上部出血,伴有粘液;肝脏、心脏等内脏器官外观正常,分别从气管、肺脏等组织或器官进行病原分离。

1.1.2 主要试剂和仪器

胶回收试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、DNA Marker 等,宝日医生物技术(北京)有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F 及 1492R,武汉华大基因科技有限公司;水解乳蛋白和酵母浸出物,OXOID 公司;猪血清、酚酞二磷酸五钠水合物、氯化三苯基四氮唑等,索莱宝科技有限公司;SPF 鸡和 SPF 鸡胚,山东省农业科学院家禽研究所。生物安全柜,苏州安泰空气技术有限公司;PCR 仪,Applied Biosystems 公司。

1.2 病原分离和纯化

利用无菌的棉拭子蘸取患病孔雀气管内粘液接种支原体改良 Frey 氏液体培养基^[9],37 °C 培养 1-3 d,当液体由红变黄时,立即接种改良 Frey 氏固体培养基^[9]进行纯培养。若发现初次培养液体浑浊,经过 0.45 μm 滤膜过滤,再按照 1:10 的体积比接种液体培养基进行增殖。

将确定无污染的支原体液体再接种于固体培养基,置于含 5% CO₂ 的 37 °C 恒温箱培养 4-7 d,挑取固体培养基上支原体单菌落接种于液体培养基培养至颜色变黄,取菌液继续接种于固体培养基,如此重复 3 次,即可获得支原体的纯培养。将以上纯培养物添加终浓度为 30% 的甘油,-80 °C 冻存备用。

1.3 形态学观察

1.3.1 菌落形态学

将纯化后的分离菌接种支原体固体培养基,置于含 5% CO₂ 的 37 °C 恒温箱培养 4-7 d,利用 Dienes 染色 1 min,在低倍显微镜下观察菌落的形态。同时,设大肠杆菌为 Dienes 染色对照。

1.3.2 菌体吉姆萨(Giemsa)染色

取固体培养基培养的菌落或者将支原体的液体培养液 10 000 r/min 离心 10 min,取菌体沉淀,均匀涂布于载玻片,甲醇固定 1 min,Giemsa 染色 1 h,在油镜下观察菌体形态。

1.4 细菌 L 型鉴别

将纯化的菌液按 1:10 的体积比接种于不含青霉素和醋酸铊的改良 Frey 氏液体培养基,连传 10 代,将终产物接种支原体固体培养基,培养 4-7 d,观察菌落的形态,进行 Dienes 染色。

1.5 生化实验和生物学特性

按照文献[9]的方法对分离菌株和 MG、MS 等分别进行生理生化和红细胞吸附试验。

1.6 致病性研究

1.6.1 SPF 鸡胚

取 15 个 6 日龄 SPF 鸡胚,每胚卵黄囊途径接种 200 μL 新鲜菌液;另设 5 个 SPF 鸡胚接种无菌生理盐水作为对照,置 37 °C 温箱培养,每日照蛋,10 d 后观察鸡胚病变。

1.6.2 SPF 鸡

取 10 只 4 周龄 SPF 鸡按滴鼻和点眼途径接种 500 μL 新鲜菌液;另设 5 只 SPF 鸡隔离饲养,作为健康对照。在攻毒后 2 周内,每天观察每只鸡的临床症状,同时在攻毒后的 48-120 h,采集攻毒鸡

的咽喉棉拭子进行病原分离。实验结束后剖检所有的实验鸡。

1.7 最小抑菌浓度实验(MIC)

按照文献[10]的方法对分离的菌株进行最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)测定。

1.8 分子生物学鉴定和基因组测序

1.8.1 细菌 16S rRNA 基因分子鉴定

将新鲜菌液 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 利用通用引物 27F (5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')对菌株进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。PCR 反应体系: 10×PCR Buffer 2.5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 模板 DNA 5 μL, DEPC 水补充总体积至 25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。利用 1.5% 的琼脂糖对 PCR 产物进行凝胶电泳, 选取目的条带进行 DNA 回收, 连接 pMD18-T 载体, 转化 DH5α, 接种 LB 固体培养基培养 16 h, 挑取菌落进行 PCR 鉴定。将阳性菌落接种 LB 液体培养基增菌, 送华大基因进行测序。

1.8.2 16S rRNA 基因系统发育树

选择 MG、MS 和 MGC 等禽类支原体以及其他动物支原体的 16S rRNA 基因的核苷酸序列, 利用 Lasergene 7.1 和 MEGA 5 软件, 比较其核苷酸相似性, 并采用邻接法(neighbor-joining)构建支原体的系统发育树, 探讨不同菌株之间的系统演化关系^[11]。

1.8.3 基因组序列及其相关分析

按 1.8.1 法提取菌体 DNA, 构建 Illumina HiSeq 小片段文库及 PacBio20kb 文库, 利用 Illumina 和 PacBio 平台测序, 对测序产物进行 Illumina 和 PacBio 的联合组装, 最终获得该分离株的全基因组序列, 参照相关文献对基因组序列进行分析^[12-14]。

2 结果与分析

2.1 病原鉴定

2.1.1 支原体的分离、纯化和形态学及其染色

从发病孔雀肺脏、肝脏和脾脏等未分到细菌, 但从其气管黏膜分离到一株疑似支原体菌株。初次分离支原体的液体培养基在 30 h 后颜色由红色开始变橘黄或黄色, 且呈现极轻微浑浊, 检测未发现细菌污染。为确保其纯粹, 将上述培养液经细菌滤膜过滤, 再次接种到液体培养基增殖。取菌液接种于固体培养基, 置于含 5% CO₂ 的温箱 37 °C 培养 4-7 d, 肉眼可见细小、光滑、圆形、透明的菌落。在低倍显微镜下(放大 40 倍)观察到了中间突起的支原体典型“煎蛋样”菌落, 直径为 0.2-0.4 mm (图 1A)。菌液经吉姆萨染色, 在油镜下可观察到较小的淡紫色圆形菌体, 直径为 0.1-0.3 μm (图 1B)。挑取单菌落进行纯化培养, 最终获得了一株纯化的支原体菌株, 命名为 Peacock20181011。利用 Dienes 染色鉴定显示, 该菌菌落呈蓝色, 不易褪色(图 1C), 而对照的大肠杆菌菌落则不易染色, 尖端由蓝色褪变为白色(图 1D)。由此证明, Peacock20181011 为支原体。

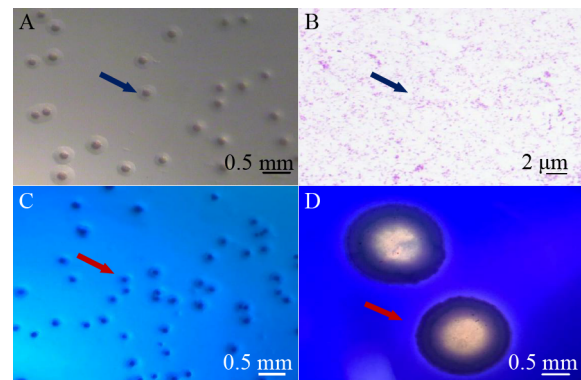


图 1 新分离培养物的菌落形态及其染色的比较

Figure 1 Comparison of colony morphology and different staining of new isolation culture

注: A: “煎蛋样”菌落; B: 吉姆萨染色; C: 新分离菌 Dienes 染色; D: 大肠杆菌 Dienes 染色。

Note: A: “Fried egg style” colony; B: Giemsa staining; C: Dienes staining of novel isolate; D: Dienes staining of *E. coli* as control.

2.1.2 生化试验和生物学特性

对 Peacock20181011 菌株进行生化特性和红细胞吸附试验, 具体结果见表 1。该菌生长需要胆固醇, 能够发酵葡萄糖、乳糖, 不水解精氨酸和尿素, 不形成膜斑, 无磷酸酯酶活性, 不还原四氮唑, 无吸附红细胞特性。该结果显示, 分离菌与 MGC 的主要特征完全相似, 而与 MG、MS 等差别较大, 因此, 推测该菌属于 MGC。

2.1.3 细菌 L 型鉴别

Peacock20181011 菌株在无抗生素的培养基中连传 10 代, 在固体培养基上仍可保持原来形态, 在低倍镜下呈“煎蛋样”菌落, 且能通过 0.45 μm 滤膜, Dienes 染色呈蓝色, 表明该菌不是细菌 L 型。

2.2 致病性试验

2.2.1 SPF 鸡胚

将菌株卵黄囊途径接种 6 日龄 SPF 鸡胚培养

表 1 Peacock20181011 和其他常见禽源支原体的生化试验和生物学特性比较

Table 1 Comparison of biochemical experiments and biological characteristics between Peacock20181011 and other common avian mycoplasma

菌种 Strains	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Peacock20181011	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>M. gallinaceum</i>										
NCTC10183	+	NA	-	NA	-	+	-	-	-	-
<i>M. gallinaceum</i>										
鸡支原体	-	NA	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>M. gallinarum</i>										
鸡毒支原体	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>M. gallisepticum</i>										
火鸡支原体	-	-	+	-	-	+	+	-	+	d
<i>M. meleagridis</i>										
衣阿华支原体	+	NA	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>M. iowae</i>										
滑液囊支原体	+	-	-	-	+	+	-	-	w	+
<i>M. synoviae</i>										

注: A: 发酵葡萄糖; B: 发酵乳糖; C: 水解精氨酸; D: 水解尿素; E: 膜斑形成; F: 胆固醇需要; G: 磷酸酯酶活性; H: 需氧四氮唑还原; I: 厌氧四氮唑还原; J: 红细胞吸附; d: 不定; NA: 未知; +: 阳性; -: 阴性; w: 弱反应。

Note: A: Fermented glucose; B: Fermented lactose; C: Hydrolyzed arginine; D: Hydrolyzed urea; E: Plaque formation; F: Sterol required; G: Phosphatase activity; H: Oxytetrazole reduction; I: Anaerobic tetrazole reduction; J: Erythrocyte adsorption; d: Indefinite; NA: No data available; +: Positive; -: Negative; w: Weak reaction.

10 d, 鸡胚未见死亡, 但存在发育迟缓、生长不良和爪部蜷缩等病变(图 2), 平均体重仅 14.38 g, 而对照组为 18.70 g。利用 SPSS 软件进行统计学分析, 接菌组与对照组鸡胚的体重差异显著 ($0.01 < P = 0.04 < 0.05$)。

2.2.2 对 SPF 鸡的致病性

在攻毒后的 2 周内, 鸡群每天的精神、食欲等基本正常, 仅在接种后的前 2 天有轻微的呼吸道症状。2 周后, 剖检攻毒鸡, 其气管、气囊、肺和肝脏等均未见肉眼可见的病变。但对攻毒后 48–120 h 的鸡群进行病原分离, 结果均分离到支原体。对攻毒鸡的咽喉棉拭子进行支原体 16S rRNA 基因的核酸检测, PCR 结果均呈现阳性, 而对照鸡均为阴性。120 h 以后, 病原分离率和核酸阳性率明显降低, 这表明支原体在攻毒鸡群中发生了复制和感染。

2.3 最小抑菌浓度测定

新分离菌株对常见的 8 种抗生素的最小抑制浓度测定(MIC)结果见表 2, 显示出该菌对药物硫酸新霉素、酒石酸泰乐菌素、乳酸环丙沙星、单硫酸卡那霉素、氟苯尼考和盐酸多西环素敏感, 而对阿莫西林和氨苄西林钠不敏感。

2.4 分子生物学鉴定

2.4.1 菌株的 16S rRNA 基因 PCR

该分离菌株的 16S rRNA 基因 PCR 产物长度约 1 400 bp, 电泳结果见图 3, 与测序结果(1 386 bp, GenBank 登录号 MN420815)相符。



图 2 鸡胚接种致病性试验结果

Figure 2 Results of pathogenicity test of chicken embryo

注: A: 病变鸡胚; B: 健康对照。

Note: A: The experimental group; B: The control group.

表 2 8 种常见抗生素对 Peacock20181011 的 MIC

Table 2 MIC of eight common antibiotics against Peacock20181011

抗生素 Antibiotic	含量 Content	最小抑菌浓度 MIC ($\mu\text{g/mL}$)	生产厂家 Manufacturer
硫酸新霉素 Neomycin sulfate (NEO)	655 U/mg	12.5	宜昌三峡制药有限公司 Yichang Sanxia Pharmaceutical Company Limited
氨苄西林钠 Ampicillin sodium (AMP)	88.7%	>5 000	齐鲁天和惠世制药有限公司 Qilu Tianhe Pharmaceutical Company Limited
酒石酸泰乐菌素 Tylosin tartrate (TYL)	800 U/mg	39	浙江普洛康裕生物制药有限公司 Zhejiang Plo Kangyu Biopharmaceutical Company Limited
乳酸环丙沙星 Ciprofloxacin lactate (CIP)	98.7%	12.5	上海京新药业有限公司 Shanghai Jingxin Pharmaceutical Company Limited
单硫酸卡那霉素 Kanamycin sulfate (KAN)	799 U/mg	7.812 5	山东齐发药业有限公司 Shandong Qifa Pharmaceutical Company Limited
氟苯尼考 Florfenicol (FFC)	98.9%	6.25	浙江康牧药业有限公司 Zhejiang Kangmu Pharmaceutical Company Limited
阿莫西林钠 Amoxicillin (AMX)	70%	1 250	湖北鑫润德化工有限公司 Hubei Xinrunde Pharmaceutical Company Limited
盐酸多西环素 Doxycycline Hydrochloride (DO)	91.6%	9.766	扬州联博药业有限公司 Yangzhou Lianbo Pharmaceutical Company Limited

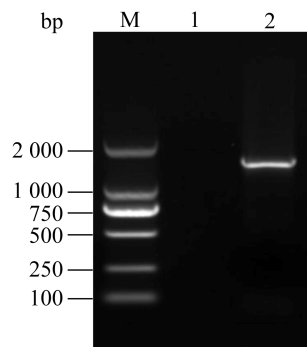


图 3 分离株 16S rRNA 基因的 PCR 检测

Figure 3 Determination of isolate strain 16S rRNA gene by PCR

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: 空白对照; 2: 分离株.

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: Blank control; 2: Isolate strain.

2.4.2 菌株 16S rRNA 基因序列分析

利用 Lasergene 7.1 进行 16S rRNA 基因的核苷酸序列同源性比较, Peacock20181011 与 MGC 模式菌株 NCTC10183、B2096.8B、B3381-15-2 和 B2888-13-1A 等高度同源, 其相似性均在 98.4% 以上, 而与 MG、MS 的相似性分别为 73.2%–75.4%、88.0%–91.2%, 差异明显较大, 与猪鼻支原体 (*M. hyorhinis*)、牛支原体 (*M. bovis*) 和山羊支原体 (*M. capricolum*) 的相似性分别为 85.3%、89.0% 和 77.6%, 结果见表 3。

2.4.3 菌株 16S rRNA 基因的系统发育树

由图 4 所示, 分离菌与 MGC 的标准模式菌

表 3 Peacock20181011 与参考支原体菌株 16S rRNA 基因的核苷酸相似性

Table 3 Nucleotide sequence identities of the 16S rRNA genes of isolate Peacock20181011 and other reference strains

菌株 Strains	登录号 Accession No.	种 Species	宿主 Host	相似性 Identity (%)	分离国家 Country of origin	16S rRNA 基因长度 Length of 16S rRNA gene (bp)	分离时间 Year of isolation
NCTC10183 ^T	LR214950	<i>M. gallinaceum</i>	Chicken	99.8	UK	1 498	1982
B20968B	CP011021	<i>M. gallinaceum</i>	Chicken	98.4	South Africa	1 534	2014
WVU1853 ^T	CP011096	<i>M. synoviae</i>	Gallus	88.0	USA	1 508	1964
PG16 ^T	NR044638	<i>M. gallinarum</i>	Chicken	88.3	USA	1 435	1955
17529 ^T	NR025914	<i>M. metlagridis</i>	Turkey	89.0	USA	1 437	1965
PG30 ^T	NR025064	<i>M. iners</i>	Chicken	89.1	USA	1 467	1960
ATCC VR-2580	AF121890	<i>M. hyorhinis</i>	Swine	85.3	USA	1 473	1999
M1601	HM155915	<i>M. capricolum</i>	Goat	77.6	China	1 432	2010
695 ^T	NR044669	<i>M. iowae</i>	Turkey	73.8	USA	1 461	1982
PG31 ^T	JN935840	<i>M. gallisepticum</i>	Chicken	73.9	USA	1 437	1960
MYC83	KX462435	<i>M. bovis</i>	Cattle	89.0	Hungary	1 520	2015

注: ^T: 标准模式菌株.Note: ^T: Type strain.

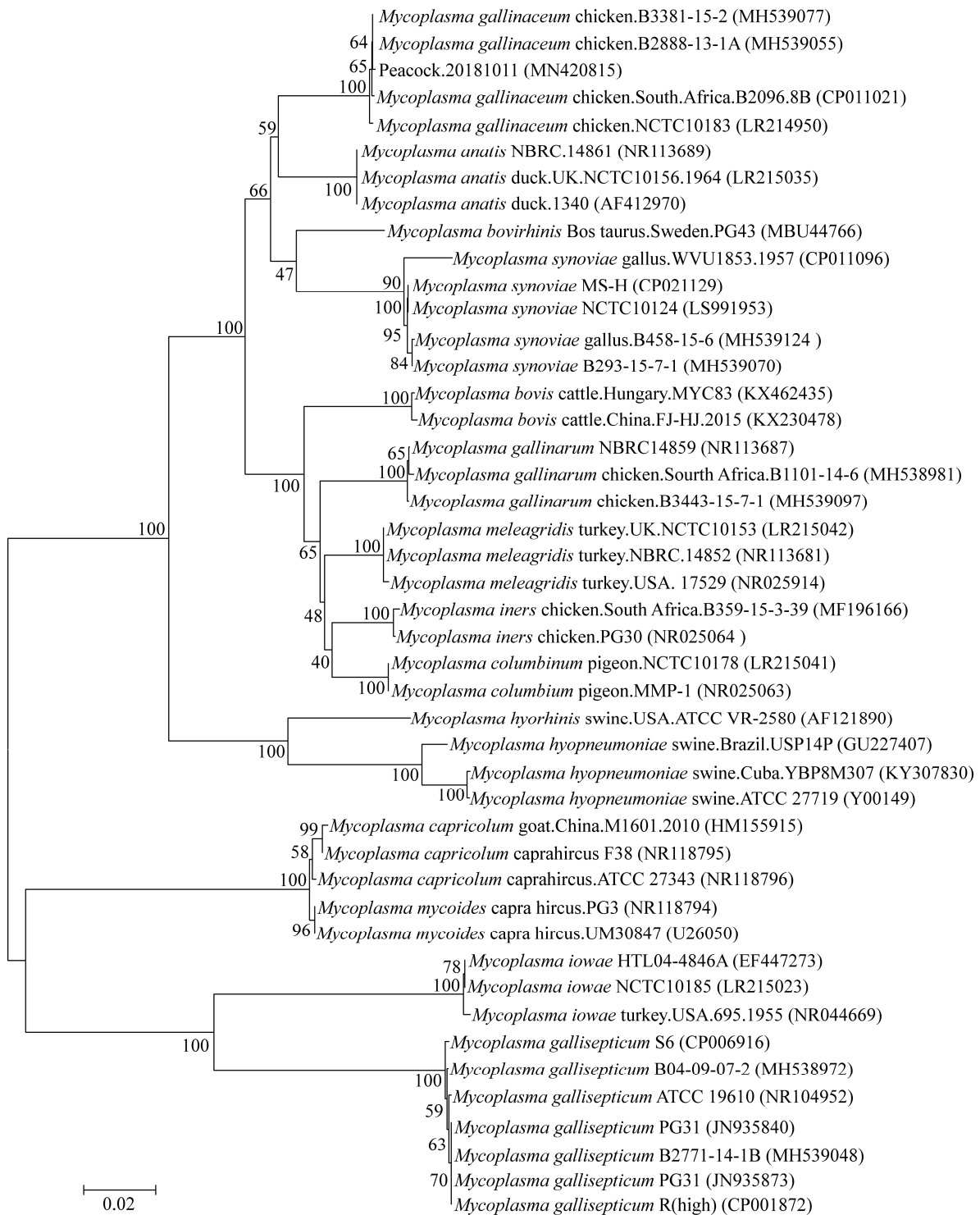


图4 Peacock20181011菌株和其他支原体菌株的16S rRNA基因系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene of Peacock20181011 and other mycoplasmas

注: 分支点上的数字表示构建系统树时1000次计算形成该节点的百分比, 标尺长度代表2%的16S rRNA基因序列的进化差异。

Note: The bootstrap values (%) presented at the branch points were calculated from 1000 replications; The ruler length means a 2% nucleotide sequence difference.

株 NCTC10183 及 B3381-15-2、B2096.8B 等位于一个分支, 遗传演化关系相对较近; 与鸭支原体 (*M. anatis*)、MS、牛支原体 (*M. bovis*) 及鸡支原体 (*M. gallinarum*) 等则处于不同的分支; 而与 MG、MI 和山羊支原体 (*M. capricolum*) 则处于遗传演化关系较远的分支, 呈现出较远的遗传距离。

2.4.4 基因组测序

测序结果显示, 该菌株基因组全长为 1 183 913 bp; 预测有 898 个 CDS 基因; 含有 3 个拷贝 5S rRNA, 4 个拷贝 16S rRNA, 4 个拷贝 23S rRNA; (G+C)mol% 含量为 28.7%。串联重复序列 (tandem repeat, TR) 125 个, 总长为 15 308 bp; 非编码 RNA 为 46 个。

Cluster of orthologous groups of proteins (COG) 数据库蛋白功能注释比对结果表明, 392 个基因完成了蛋白注释, 占全部基因的 30.06%。在所有注释蛋白中, 功能基因较多, 有 131 个, 主要参与翻译、核糖体结构和生物合成等; 其次是参与碳水化合物的运输和代谢的基因, 有 51 个; 参与复制重组和修复的基因有 37 个。上述各功能注释基因占 COG 的百分比依次是 32.8%、12.8% 和 9.27%^[15]。

细菌致病菌毒力因子 (virulence factors of pathogenic bacteria, VFDB) 数据库比对结果显示, 含有 20 个毒力因子基因。耐药基因 (antibiotic resistance genes database, ARDB) 比对显示, 含有 2 个四环素耐药基因。

3 讨论与结论

本实验从患呼吸道病的孔雀气管粘液中分离到一株疑似支原体的病原, 经对病原体的分离和纯化、形态学观察、Dienes 染色及生化试验等证实为支原体。与常见的 MG 和 MS 不同, Peacock20181011 菌株生长速度较快, 经过 2-3 次纯培养后, 液体培养 12-20 h 即可观察到培养基颜色的变化, 而 MG 和 MS 等其他支原体一般在

1-3 d 才发生颜色的改变。致病性研究显示, 该菌株不会引起 SPF 鸡病变, 不会致死鸡胚, 但可引起鸡胚发育迟缓以及爪部蜷缩等病变, 具有一定的鸡胚致病性。结合 16S rRNA 基因测序, 该菌与 MGC 经典模式菌株 NCTC10183 (LR214950) 的相似性为 99.86%, 而与家禽经典菌株 MG、MS 的相似性仅为 73.2%-75.4% 和 90.7%-93.2%; 与猪肺炎支原体、牛支原体和羊支原体的相似性约为 84.0%、88.5% 和 77.6%。上述结果证实, 该分离株为支原体属的 MGC 新菌株。

在这次病原分离、鉴定过程中, 在发病孔雀体内同时分离到了传染性喉气管炎病毒 (infectious laryngotracheitis virus, ILTV), 证实了此次孔雀发生的呼吸道疾病是由 MGC 和 ILTV 共同引起的, 是一种混合感染。Beylefeld 等对 2003-2015 年间从南非家禽粪便中分离出的 178 株支原体菌株进行了分离鉴定, 结果发现 MGC 在家禽粪便中分离率高达 23%, 仅次于具有致病性的 MG (25%)^[8]。中国是一个养殖大国, 但对于 MGC 在中国养禽业流行的现状尚缺乏相关的调查, 值得进一步的研究。

支原体无细胞壁, 对大多数 β -内酰胺类抗生素不敏感。本实验研究了 MGC 对 8 种常见抗生素的药敏特性, 证实分离株对 AMP 和 AMX 不敏感, 对 NEO、TYL、CIP、KAN、FF、DO 敏感^[6], 并指导应用于临床, 取得了较好的防治效果。

支原体是目前发现的能独立生存的最小微生物, 其基因组被视为生物生存所必需的最低标准, 因此, 对其基因组的研究有助于阐明作为一个能够自我复制的极小单位的基本功能。全基因组测序表明, 新分离菌株的基因组全长为 1 183 913 bp, (G+C)mol% 含量为 28.7%, 与英国支原体模式菌株 NCTC10183 高度像似 (基因组长度为 1 074 838 bp, (G+C)mol% 含量为 28%), 而与 2015 年 Abolnik 等分离的南非 MGC 毒株 B2096.8B (CP011021) 有明显差异, 后者的基因组全长仅为 845 307 bp^[17]。很显然, 中国菌株的

基因组比国外同种的菌相对较长, 具有显著的中国特色。

REFERENCES

- [1] Stipkovits L, Kempf I. Mycoplasmoses in poultry[J]. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 1996, 15(4): 1495-1525
- [2] Michiels T, Welby S, Vanrobaeys M, et al. Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial poultry, racing pigeons and wild birds in Belgium[J]. *Avian Pathology*, 2016, 45(2): 244-252
- [3] Swayne DE. *Diseases of Poultry*[M]. 13th ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, 2013: 875-912
- [4] Wijesurendra DS, Kanci A, Tivendale KA, et al. Immune responses to vaccination and infection with *Mycoplasma gallisepticum* in turkeys[J]. *Avian Pathology*, 2017, 46(5): 464-473
- [5] Wu YM, Ye KY. *Mycoplasma*[M]. 2nd ed. Beijing: People's Health Publishing House, 2008: 9-19 (in Chinese)
吴移谋, 叶康元. 支原体学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 9-19
- [6] Bradbury JM, Yavari CA, Dare CM. Mycoplasmas and respiratory disease in pheasants and partridges[J]. *Avian Pathology*, 2001, 30(4): 391-396
- [7] Adeyemi M, Bwala DG, Abolnik C. Comparative evaluation of the pathogenicity of *Mycoplasma gallinaceum* in chickens[J]. *Avian Diseases*, 2018, 62(1): 50-56
- [8] Beylefeld A, Wambulawaye P, Bwala DG, et al. Evidence for multidrug resistance in nonpathogenic *Mycoplasma* species isolated from South African poultry[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(21): e01660-18
- [9] Bi DR, Wang GZ. *Animal Mycoplasma and Research Methods*[M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 1998: 150-152 (in Chinese)
毕丁仁, 王桂枝. 动物霉形体及研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 150-152
- [10] Hannan PCT. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species[J]. *Veterinary Research*, 2000, 31(4): 373-395
- [11] Wang YZ. Isolation and identification of *Mycoplasma bovis* and analysis of its complete genome sequence[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2014 (in Chinese)
王艳杰. 牛支原体的分离鉴定及其全基因组序列测定与分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2014
- [12] Leigh SA, Evans JD, Branton SL. Complete genome sequences of two *Mycoplasma gallisepticum* F-strain variants[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2019, 8(33): e00485-19
- [13] Zhu L, Shahid MA, Markham J, et al. Genome analysis of *Mycoplasma synoviae* strain MS-H, the most common *M. synoviae* strain with a worldwide distribution[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 117
- [14] Wei S. Genome sequencing and analysis of *Mycoplasma iowa* and *Mycoplasma synoviae*[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2012 (in Chinese)
魏顺. 衣阿华支原体与滑液支原体的全基因组测序及分析[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2012
- [15] Chen SL, Hao HF, Yan XM, et al. Genome-wide analysis of *Mycoplasma dispar* provides insights into putative virulence factors and phylogenetic relationships[J]. *Genes, Genomes, Genetics*, 2019, 9(2): 317-325
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI M07-ED11 and M100-ED28 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-eighth informational supplement[S]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018
- [17] Abolnik C, Beylefeld A. Complete genome sequence of *Mycoplasma gallinaceum*[J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(4): e00712-15