

## 山羊传染性胸膜肺炎病原体 4 株国内分离株的重新分类

李 媛<sup>1</sup> 张建华<sup>1</sup> 胡守萍<sup>1</sup> 王 亮<sup>1</sup> 辛九庆<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室 哈尔滨 150001)

(<sup>2</sup>东北农业大学动物医学院 哈尔滨 150030)

**摘 要:**山羊传染性胸膜肺炎(Contagious Caprine Pleuropneumonia, CCPP)是由山羊支原体山羊肺炎亚种(*M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, Mccp)引起的高度接触性传染病,对 4 株 CCPP 中国分离株进行分子特征研究,确定其分类地位。针对 3 段基因(A、B、C)对扩增产物进行酶切鉴定和测序,将结果与丝状支原体簇的 6 个成员进行遗传衍化分析。在 A 片段 4 株中国分离株的扩增产物经 PstI 酶切后的结果与 Mccp 代表株 F38 相同,为 548、420、128 等 3 条带,其他 5 个丝状支原体簇成员只有 420、128bp 两条带。在 B 片段,序列分析结果显示 4 株中国分离株与 F38 同源性为 99.5%,与山羊支原体山羊亚种 Mcc 代表株 kid 的同源性为 98.9%,与丝状支原体山羊亚种 Mmc ZZ 株同源性仅为 95.4%。在 C 片段研究发现 4 株中国分离株的序列与 Mmc 模式株 PG3 株同源性为 67.4% ~ 67.6%,与 2 株 Mcc 8601-50 和 California Kid 同源性为 95.1% ~ 98.4%,与 3 株 Mccp 97097ET、Gages 和 F38 的同源性为 99.6% ~ 99.8%。通过对中国分离的 87001、87002、367、1653 等 4 株 CCPP 病原体的分子特征研究,首次提出其与山羊支原体山羊肺炎亚种(Mccp)亲缘关系最近,应归属为 Mccp,并将国内流行的山羊传染性胸膜肺炎的病原定名为 Mccp。

**关键词:**山羊传染性胸膜肺炎;山羊支原体山羊肺炎亚种;山羊支原体山羊亚种

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2007)05-0769-05

山羊传染性胸膜肺炎(CCPP)是山羊特有的急性或慢性高度接触性传染病,以呈现纤维素性肺炎和胸膜炎为特征。最早是由 Thomas 在 1873 年描述的,稍后由 Hutcheon 在 1881 年<sup>[1]</sup>证明了该病的传染性<sup>[1]</sup>。CCPP 在羊群中发病率可达 100%,急性死亡率可达 60% ~ 70%,被世界动物卫生组织(OIE)列为山羊烈性传染病,目前在亚洲和非洲至少有 38 个国家存在本病<sup>[2]</sup>。我国内蒙古百灵庙地区于 1935 年曾流行山羊的“烂肺病”<sup>[3]</sup>,此后内蒙、宁夏、甘肃、西藏、四川、山东、浙江、辽宁、福建等省、自治区流行该病,1949 ~ 1989 年的四十年间,累计发病羊 89 万多只,死亡 32 万多只<sup>[4]</sup>。近几年在我国湖南、河南等 10 个省、自治区仍有 CCPP 流行的报道。

丝状支原体簇共有 6 个成员,除山羊支原体山羊肺炎亚种(*M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, Mccp)外,还包括:山羊支原体山羊亚种(*Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, Mcc);丝状支原体丝状亚种 SC 型(*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, MmmSC);丝状支原体丝状亚种 LC 型(*M. mycoides*, subsp. *mycoides* Large colony LC, MmmLC);丝状支原体

山羊亚种(*M. mycoides* subsp. *capri*, Mmc);牛支原体第七群(*Mycoplasma* subsp. *bovine group 7*, Mbg7),其中, MmmLC、Mmc、Mcc 也都可以引起羊的呼吸系统疾病,但是 CCPP 的病变,仅限于胸腔,而 MmmLC 等 3 种支原体引起的疾病通常伴有其他器官的损害和(或)除胸腔外集体其他部分病变。此外,绵羊肺炎支原体也可引起绵羊和山羊肺炎<sup>[5]</sup>。

MacOwan 于 1976 年在肯尼亚首次成功分离出 Mccp,命名为 F38,并在山羊上成功复制出 CCPP,并将这一病原命名为山羊支原体山羊肺炎亚种(Mccp)<sup>[13]</sup>,此后在中非东非中东等地区又先后分离出多株 Mccp<sup>[8-12]</sup>。

我国在上世纪五十年代分别从新疆、山东、山西采集 CCPP 病羊肺脏,并用羊体或鸡胚传代培养,用于疫苗生产。王栋等<sup>[6]</sup>以 Mmc 模式菌株 PG3、MmmSC 模式菌株 PG1、无乳支原体(*M. agalactiae*)模式菌株 PG2、绵羊肺炎支原体(*M. ovipneumoniae*)模式菌株 Y-98 这 4 株菌为模式株和对照株,采用生长抑制试验和间接荧光抗体法对新疆、山东和山西等地分离的 3 株支原体进行实验,得出结论与 Mmc

基金项目:国家“十五”科技攻关重大专项基金项目(2002BA518A04)

\* 通讯作者。Tel 86-451-85935091; Fax 86-451-82733132; E-mail: xinjiaqing2001@sohu.com

作者简介:李 媛(1972-),山东海阳人,助研,硕士,研究方向为动物分子流行病学与诊断学。Email: yuanlee72@126.com

其他作者:乔祖健<sup>2</sup>

收稿日期:2007-01-04;接受日期:2007-04-17;修回日期:2007-06-20

菌株 PG3 亲缘关系最近,因而把国内 CCPP 的病原归为丝状支原体山羊亚种(Mmc)。邱立新等<sup>[7]</sup>从湖南怀化分离出两株支原体,亦以 PG3 和 Y-98 为对照株,生长抑制试验结果亦与 PG3 相近,也称之为 Mmc。

目前国际上对 Mccp 的诊断,除了一些常规鉴别方法外,分子生物学方法也得到了广泛地运用。资料显示先后应用于 Mccp 鉴别的技术包括 CAP21 探针技术<sup>[14]</sup>、PCR 与 REA 技术<sup>[15]</sup>、特异性 PCR 技术<sup>[16]</sup>和序列缺失鉴别技术<sup>[17]</sup>等分子生物学鉴别方法。常规鉴别方法,如生长抑制试验、生长沉淀试验和间接免疫荧光抗体试验等存在交叉反应,难以对其进行准确的鉴定<sup>[5]</sup>。因此,本研究利用 PCR 技术、限制性酶切、序列分析等手段对国内分离的 4 株 CCPP 病原体进行分子特征研究,为其准确分类提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种及培养基

丝状支原体菌株 87001、87002、367、1653 购自中国兽医药品监察所。87001、87002 为发病羊肺组织冻干物,367、1653 为鸡胚致弱毒冻干物,87001 和 367 为国内制造 CCPP 灭活疫苗用菌株,87002 是检验灭活疫苗用菌株。MmmSC 标准株 PG1、MmmLC 标准株 Y-goat 购自中国兽医药品监察所。

改良 hayflick 培养基,参照 Thiaucourt 的配方<sup>[18]</sup>,100mL 液体培养基中主要成分包括:牛心汤 30mL,马血清 20mL,1% 乳汉液 47mL,新鲜酵母浸出液 2mL,1/80 醋酸铊 1mL,青霉素 200u/mL。

### 1.2 试剂

实验所用 Ex Taq 酶及 dNTP 等 PCR 反应试剂及 pMD18-T 载体试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。*Pst* I 购自美国 Invitrogen 公司。组织/细胞 DNA 提取试剂盒和胶回收试剂盒均购自上海华舜生物技术公司。

### 1.3 菌种培养及纯化

用 2mL 改良 hayflick 培养基溶解冻干菌种,以十倍递减稀释到第 5 管,置 37℃ 培养。4 天后收集第 4、5 管培养物,以 13000r/min 离心 15min 后,弃去上清,沉淀的菌体重悬于 TE(pH8.0),-20℃ 保存备用。菌体基因组 DNA 提取使用组织/细胞 DNA 提取试剂盒(上海华舜生物技术公司),按照其说明书进行操作,得到的基因组 DNA 直接用于 PCR 扩增。

### 1.4 引物设计

选择 A、B、C 共 3 个 DNA 片段用于研究。片段 A 选自 16S rRNA;片段 B 是支原体 RpsL 和 RpsG 基因间的一段,是已知核酸探针 Cap-21 的一部分;片段 C 位于 H2 和 H2prim 基因间<sup>[14,17,19]</sup>。针对上述 3 个基因片段设计了 3 对引物(表 1)。

表 1 用于 PCR 和序列分析的引物

Table 1 Primers used in sequencing and PCR

Fragment	Genome Position	Name	Sequence(5'→3')	Size of sequence/bp	Accession No. Genbank
Fragment A	16s rRNA	M1	CGA AAG CGG CTT ACT GGC TTG TT	548	AF202924
		M2	TTG AGA TTA GCT CCC CTT CAC AG		
		M3	CAA GGT GTA GCA AAA CGT TCT CAA GGA C		
Fragment B	RpsL and RpsG(CAP-21)	M4	ACC GGA TCC CTG TAT TCT CTA GCC ATT	670	M96589
		M5	CGG GGA TCC GGT ATT GTT GTT GGA AGT		
Fragment C	H2 and H2prim	M6	CGG GTC GAC GCT CCA TCA AAC ATA GAT	630	AF162991

### 1.5 PCR 扩增

分别用表 1 中 3 对引物对 6 株菌体 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应液的总体积为 50 $\mu$ L,循环参数如下:94℃ 2min,94℃ 1min,55℃ 30s,72℃ 1min,共 30 个循环,72℃ 延伸 10min。反应结束后取 10 $\mu$ L 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳 40min(100V),在紫外光下观察 PCR 产物大小。

### 1.6 酶切鉴定

将以 M1、M2 为引物扩增出的 PCR 产物用胶回收试剂盒(上海华舜生物技术公司)回收,以 *Pst* I (Invitrogen 公司)进行酶切,酶切产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳 40min(100V),在紫外光下观察酶切结果。

### 1.7 基因片段的克隆及序列分析

用表 1 中的 3 对引物扩增 6 株菌体 DNA,PCR 产物克隆到 pMD-18 Vector(大连宝生物公司)中,送上海生工公司进行测序。用 MegAlign 软件对测序结果与 GenBank 中已知菌株的序列进行比较,并绘制进化树。

## 2 结果

### 2.1 菌体 DNA PCR 扩增结果

6 株菌体 DNA 用 M1M2 引物扩增,均扩增出 548bp 的条带,以 M3M4 引物扩增,均扩增出 670bp 左右片段。4 株中国分离株菌体 DNA 以 M5M6 引物扩增片段为 630bp(图略)。

## 2.2 片段 A PCR 和酶切鉴定结果

图 1 所示 , 将 6 株菌体 DNA 以 M1M2 为引物扩增出的 548bp 片段用 *Pst* I 酶切后 , 发现 87001 等 4 株酶切后存在 3 条带 , 分别为 548bp、420bp 和 128bp。而 PG1 和 Y-goat 酶切后只见 420bp 和 128bp。

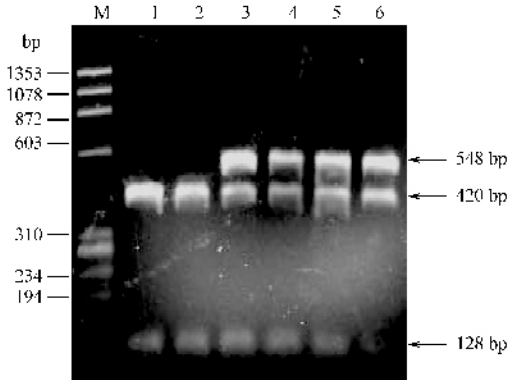


图 1 片段 A 的 *Pst* I 酶切鉴定

Fig.1 Identification of fragment A by restriction endonuclease digestion  
M :  $\Phi$ X174 , Lane 1 PG-1 , Lane 2 Y-goat ; Lane 3 87001 ; Lane 4 87002 ;  
Lane 5 367 ; Lane 6 1653 .

## 2.3 片段 A 的序列分析结果

16S rRNA 是高度保守的基因 , 丝状支原体簇各成员间 16S rRNA 序列同源性超过 99% , 图略。通过对片段 A 即我们所扩增的 548bp 片段的序列分析发现 , 共存在 5 处 *Mccp* 特有的碱基变异。其中位于第 127 位的碱基变化 , 正是造成 *Mccp* 与其他丝状支原体家族成员 *Pst* I 酶切结果差异的原因 ( 表 2 )。

表 2 片段 A 的碱基差异分析

	127	154	362	363	429
<i>Mccp</i>	T	C	T	A	A
<i>Mcc</i>	C	A	C	G	G
<i>Mmc</i>	C	A	C	G	G
MmmLC	C	A	C	G	G
MmmSC	C	A	C	G	G
Mbov7	C	A	C	G	G
Chinese strains	T	C	T	A	A

## 2.4 片段 B 的序列分析结果

CAP-21 探针全长 1532bp , 定位于丝状支原体簇的基因组中 *RpsL* 基因 3' 端、*RpsG* 基因和 *FusA* 基因 5' 端的位置。片段 B 选自 CAP-21 的 5' 高变区部分 , 即 *RpsL* 和 *RpsG* 基因之间的区域。经序列比较分析后发现 , 87001 等 4 株中国分离株彼此之间同源性为 100%。而其与 *Mccp* F38 同源性最高 , 为 99.5% , 与 *Mcc kid* 为 98.9% , 与 *Mmc ZZ* 株为 95.4% , 与 MmmLC Y-goat 为 97.2% , 与 MmmSC Gla 为 96.9% , 与 Bovine 7 R2222 为 84.9%。87001 等 4 株中国株

与 *Mccp* 亲缘关系更近 ( 图 2 )。

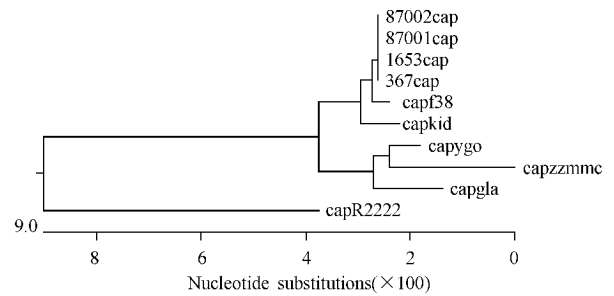


图 2 片段 B 中 4 株中国株与丝状支原体簇 6 个成员之间的系统发生进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of 4 chinese strains and six members of the *Mycoplasma mycoides* cluster in fragment B. F38 : *Mccp* , kid : *Mcc* , ygo : MmmLC , gla : MmmSC , R2222 : Bovine 7 , ZZ : *Mmc* .

## 2.5 片段 C 序列分析

片段 C 位于支原体基因组中 H2 基因 3' 端和 H2prim 基因 5' 端 , 这一段也是高可变区间。将 87001 等 4 株的测序结果与 GenBank 中的 2 个 *Mcc* 序列、3 个 *Mccp* 序列和 1 个 *Mmc* 序列进行比较 , 发现 4 株中国分离株序列与 3 个 *Mccp* 序列都在 86 ~ 114 之间碱基缺失 , 而所有 *Mcc* 和 *Mmc* 株不存在这一缺失。同源性方面 , 4 株中国分离株与 *Mmc* 模式株 PG3 ( AF162998 ) 株同源性仅为 67.4% ~ 67.6% , 与两株 *Mcc* 8601-50 ( AF162992 ) 和 California Kid ( CP000123 ) 同源性为 95.1% ~ 98.6% , 与 3 株 *Mccp* 97097ET ( AF378155 ) Gages ( AF378157 ) 和 F38 ( AF162991 ) 的同源性为 99.6% ~ 99.8% ( 图 3 )。

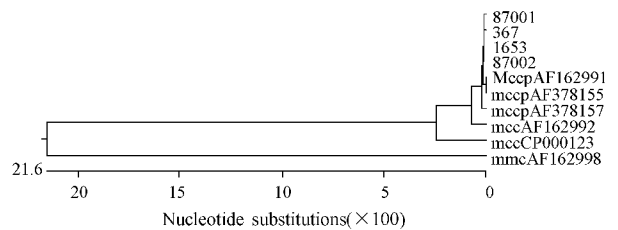


图 3 丝状支原体在片段 C 的遗传进化树

Fig.3 Homology tree constructed by analysis of fragment C of 10 mycoplasma strains .

## 3 讨论

通常认为 , 丝状支原体簇的分类鉴别生化试验不能准确鉴定分离株 ; *Mccp* 与 MmmLC、*Mmc*、*Mcc* 等支原体在生化性状上无甚差异<sup>[5]</sup>。生长抑制试验、生长沉淀试验和凝胶沉淀试验在丝状支原体簇内存在强交叉反应<sup>[20-22]</sup>。而间接荧光试验 , *Mccp* 也常因为其他原因而不出现阳性反应<sup>[23]</sup>。

补体结合试验是国际贸易指定试验 , 特异性高但敏感性较差 ; 间接血凝试验敏感但是与 *Mmc*、*Mcc*、MmmLC 等 3 种支原体存在交叉反应<sup>[24]</sup>。山羊

在实验条件下对丝状支原体血清阳转却并不发病,而急性 Mccp 病例很少在死前出现血清阳性,可能是由于抗体被循环支原体抗原所遮蔽。所以血清学检测只实用于畜群检查,不能做个体诊断依据<sup>[5]</sup>。

由于没有 Mccp 和 Mcc 的标准菌株和标准阳性血清作为对照,且常规试验难于区分丝状支原体簇中各成员,所以本实验选择用分子生物学方法进行鉴别。

目前,丝状支原体簇的成员中,只有 MmmSC PG1 株<sup>[25]</sup>和 Mcc ATCC 27343 (NC\_007633) 株公布了全基因组序列,而 Mccp、Mmc 都没有完整的全基因组序列,因此国际上对 Mccp 的鉴定也是依靠于个别基因的序列分析。为了慎重起见,参照了国外曾用于鉴别 Mccp 的所有 3 个基因片段来进行分析,以得出更加可靠、准确的结论。

片段 A 来自支原体高度保守的 16S rRNA 序列,这一序列被公认可以进行分类鉴别<sup>[26-29]</sup>。548bp 的 PCR 产物经 Pst I 酶切后,87001 等 4 株中国分离株呈现 548、420、120bp 的 3 条带,而对照株 MmmSC 模式株 PG1、MmmLC 模式株 Y-goat 酶切后只有 420、128bp 2 条带(图 2)。序列分析发现,4 株中国分离株的该片段与 F38 同源率为 100%。所以从片段 A 来看,4 株中国分离株应该属于 Mccp,而不是 Mmc。Mccp 与其它丝状支原体簇的这一差异被 Bascunana CR<sup>[19]</sup>解释为 16S rRNA 序列在丝状支原体簇中有两个阅读框架,被称为 rra 和 rrb。多数支原体的这两个框架是相同的,但是在 Mccp 存在一种多态性,使得 rra 和 rrb 不同,这一差异被用来鉴别 Mccp。该段序列分析表明 Mccp 标准株 F38 与 Mcc、Mmc、MmmLC、MmmSC 之间共存在 4 处共 5 个碱基的差异,其中位于该片段 5' 端第 127 位的碱基, F38 的 rra 是 T,而 rra 和其他丝状支原体簇的 rra 和 rrb 都为 C, Mccp rra 的这一变异,恰好使位于此处的 Pst I 酶切位点失效。因而,用 Pst I 酶切后, Mccp 会有 3 条带。

片段 B 来源于探针 CAP-21 中 5' 端高变区大小约为 670bp 的片段,位于丝状支原体簇的 RpsL 和 RpsG 基因之内。序列分析结果表明 87001 等 4 株中国分离株的序列与 F38 的同源性 99.5%,与 Mcc 标准株 kid 的同源性为 98.9%,而与 Mmc 菌株 ZZ 株的同源性只有 95.4%,可见亲缘关系与 Mccp 更近。

Thiaucourt 等<sup>[17]</sup>在 H2 和 H2prim 基因中长度为 1298bp 的一段发现 Mccp 特异的 28bp 碱基缺失,而 Mcc、Mmc 等支原体不存在这一缺失。片段 C 选择了其中存在缺失的 5' 端长度 630bp 的片段,我们对其进行的序列分析结果显示,87001 等 4 株也存在 28bp 的缺失,而 Mmc 菌株不存在这一缺失。同源性

比较也发现 4 株中国分离株与 Mccp 最为接近为 99.6%~99.8%,而与 Mmc (67.4%~67.6%) 相距甚远。

## 4 结论

为了确定我国 CCPP 病原菌的准确分类地位,我们采用分子生物学方法,对 4 株中国分离株基因组 3 个基因片段进行扩增、酶切和序列分析。结果证实,87001、87002、367、1653 等 4 株 CCPP 中国分离株在与丝状支原体簇的 6 个成员的遗传衍化关系比较中,更接近于 Mccp,因而建议将其重新归属于支原体属的山羊支原体山羊肺炎亚种,即 Mccp。所以我国境内流行的山羊传染性胸膜肺炎病原应为山羊支原体山羊肺炎亚种, Mccp。

## 参 考 文 献

- [1] Hutcheon D. Contagious pleuropneumonia in Angora goats. *Veterinary Journal*, 1881, **13**: 171-180.
- [2] Thiaucourt F, Bolske G. Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary mycoplasmas of sheep and goats. *Review Science Technique Office International des Epizooties*, 1996, **15**(4): 1397-1414.
- [3] 房晓文, 于光照, 刘光本. 山羊传染性胸膜肺炎氢氧化铝疫苗制造及免疫试验. *畜牧兽医学报*, 1958, **1**(1): 44-52.
- [4] 农业部畜牧兽医司. 中国动物疫病志. 第一版, 北京: 科学出版社, 1993.
- [5] 世界卫生组织. 哺乳动物、禽、蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册. 第一版, 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002.
- [6] 王 栋, 张瑞亭. 我国山羊传染性胸膜肺炎病原的研究. *中国兽医科技*, 1988, **9**: 3-5.
- [7] 邱立新, 舒晓亮, 胡述光等. 山羊支原体的分离与鉴定. *中国动物检疫*, 2002, **19**(2): 21-23.
- [8] MacMartin DA, MacOwan KJ, Swift LL. A century of classical contagious caprine pleuropneumonia: from original description to aetiology. *The British Veterinary Journal*, 1980, **136**: 507-515.
- [9] MacOwan KJ, Minette JE. A mycoplasma from acute contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. *Tropical Animal Health and Production*, 1976, **8**: 91-95.
- [10] MacOwan KJ, Minette JE. The role of mycoplasma strain F38 in contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. *Veterinary Record*, 1977, **101**: 380-381.
- [11] MacOwan KJ. Role of Mycoplasma strain F38 in contagious caprine pleuropneumonia. *Israel Journal of Medical Sciences*, 1984, **20**: 979-981.
- [12] MacOwan KJ, Minette JE. Contact transmission of experimental contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). *Tropical Animal Health and Production*, 1977, **9**: 185-188.
- [13] Leach RH, Erno H, MacOwan KJ. Proposal for designation of F38-type caprine mycoplasmas as *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* subsp. nov and consequent obligatory relegation of strains currently classified as *M. capricolum* (Tully, Barile, Edward, Theodore, and Erno 1974) to an additional new subspecies, *M. capricolum* subsp. *capricolum* subsp. nov. *International Journal of*

- [ 14 ] Taylor TK , Bashiruddin JB , Gould AR. Relationships between members of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by DNA probes and sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* ,1992 **42**( 4 ): 593 – 601 .
- [ 15 ] Bolske G , Mattsson JG , Bascunana CR , et al . Diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia by detection and identification of *Mycoplasma capricolum* subsp. *Capripneumoniae* by PCR and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology* ,1996 , **34**( 4 ): 785 – 791 .
- [ 16 ] Woubit S , Lorenzon S , Peyraud A , et al . A specific PCR for the identification of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* the causative agent of contagious caprine pleuropneumonia ( CCPP ). *Veterinary Microbiology* 2004 **104**( 1 – 2 ): 125 – 132 .
- [ 17 ] Thiaucourt F , Lorenzon S , David A , et al . Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by sequencing of a putative membrane protein gene. *Veterinary Microbiology* ,2000 **72**( 3 – 4 ): 251 – 268 .
- [ 18 ] Thiaucouri F , Bolske G , Leneguerh B , et al . Diagnosis and control of contagious caprine pleuropneumonia. *Revue Scientifique et Technique ( International Office of Epizootics )* ,1996 **15**( 4 ): 1415 – 1429 .
- [ 19 ] Bascunana CR , Mattsson JG , Bolske G , et al . Characterization of the 16S rRNA Genes from *Mycoplasma* sp. Strain F38 and Development of an Identification System Based on PCR. *Journal of Bacteriology* , 1994 **176** : 2577 – 2586 .
- [ 20 ] Dighero MW , Bradstreet CM , Andrews BE. Dried paper discs for serological identification of human mycoplasmas. *The Journal of Applied Bacteriology* ,1970 **33**( 4 ): 750 – 757 .
- [ 21 ] Jones GE , Wood AR. Microbiological and serological studies on caprine pneumonias in Oman. *Research in Veterinary Science* ,1988 , **44**( 1 ): 125 – 131 .
- [ 22 ] Krogsgaard-Jensen A. *Mycoplasma* : growth precipitation as a serodiagnostic method. *Applied Microbiology* ,1972 **23**( 3 ): 553 – 558 .
- [ 23 ] Rosendal S , Black FT. Direct and indirect immunofluorescence of unfixed and fixed *Mycoplasma* colonies. *Acta Pathol Microbiol Scand* ,1972 **80**( 4 ): 615 – 622 .
- [ 24 ] Muthomi EK , Rurangirwa FR. Passive haemagglutination and complement fixation as diagnostic tests for contagious caprine pleuropneumonia caused by the F-38 strain of mycoplasma. *Research in Veterinary Science* ,1983 **35**( 1 ): 1 – 4 .
- [ 25 ] Westberg J , Persson A , Holmberg A. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T , the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia ( CBPP ). *Genome Res* 2004 **14**( 2 ): 221 – 227 .
- [ 26 ] Bolske G , Mattsson JG , Bascunana CR , et al . Molecular evolution of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* strains , based on polymorphisms in the 16S rRNA genes. *Journal of Bacteriology* , 1998 **180**( 9 ): 2350 – 2358 .
- [ 27 ] Olsen GJ , and Woese CR. Ribosomal RNA : a key to phylogeny. *FASEB J* ,1993 **7** : 113 – 123 .
- [ 28 ] Osawa S , Jukes TH , Watanabe K , et al . Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiological Reviews* ,1992 **56** : 229 – 264 .
- [ 29 ] Lane DJ , Pace B , Olsen GJ , et al . Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1985 **82** : 6955 – 6959 .

## Reclassification of the four china isolated strains of the pathogen for contagious caprine pleuropneumonia

LI Yuan<sup>1</sup> , ZHANG Jian-hua<sup>1</sup> , HU Shou-ping<sup>1</sup> , WANG Liang<sup>1</sup> , XIN Jiu-qing<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Division of Bacterial Diseases , National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology , Harbin Veterinary Research Institute , CAAS , Harbin 150001 , China )

(<sup>2</sup> College of Veterinary Science , Northeast Agricultural University , Harbin 150030 , China )

**Abstract** : Contagious caprine pleuropneumonia ( CCPP ) is caused by *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* ( Mccp ). The aims of this study were to identify 4 Chinese isolated strains employing molecular methods and to determine the appropriate subspecies classification of these strains. Three genome fragments ( A , B and C ) from each strain were amplified and then transformed into plasmids. The inserted fragments were sequenced and analyzed by comparison with six members of the *Mycoplasma mycoides* cluster. Cleavage of the PCR products of the 4 strains with PstI yielded three fragments 548 , 420 and 128bp in length , just like strain F38. The other *M. mycoides* cluster members had only 2 fragments of 428 and 128bp. Homology analysis of fragment B indicated that the 4 strains exhibited 99.5% homology with Mccp reference strain F38 , 98.9% with *M. capricolum* subsp. *Capricolum* ( Mcc ) strain California Kid , and only 95.4% with Mmc strain ZZ. In fragment C , the 4 strains had 67.4% ~ 67.6% homology with Mmc PG3 , 95.1% ~ 98.6% with Mcc strains 8601-50 and California Kid , 99.6% ~ 99.8% with Mccp strains 97097ET , Gabes and F38. The analysis revealed that 4 pathogeny strains 87001 , 87002 , 367 , 1653 isolated from China are more closely related to Mccp than to Mcc. Therefore the pathogeny of CCPP in China should be reclassified as Mccp.

**Keywords** : Contagious Caprine Pleuropneumonia ; *Mycoplasma Capricolum* subsp. *Capripneumonia* ; *Mycoplasma Capricolum* subsp. *Capricolum*

Foundation item : The 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China ( 2002BA518A04 )

\* Corresponding author. Tel : 86-451-85935091 ; Fax : 86-451-82733132 ; E-mail : xinjiuqing2001@sohu.com

Other authors : QIAO Zu-jian<sup>2</sup>

Received : 4 January 2007 / Accepted : 17 April 2007 / Revised 20 June 2007 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>