

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

抗丝状支原体丝状亚种单克隆抗体的制备及 竞争 ELISA 抗体检测方法的初步建立

硕 士 研 究 生: 曾金红

学 号: 82101195303

指 导 教 师: 辛九庆 研究员

申 请 学 位 类 别: 兽医硕士

领 域: 兽医

培 养 单 位: 哈尔滨兽医研究所
研究生院

2022年6月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis

**Development of Monoclonal Antibody against
Mycoplasma mycoides subsp. *mycoides* and Preliminary
Establishment of cELISA Method**

Candidate: ZENG Jinhong

Student ID: 82101195303

Supervisor: Professor Xin Jiuqing

**Degree Type: Master of Professional Degree in
Veterinary Medicine**

Major: Veterinary Medicine

Institution: Harbin Veterinary Research Institute

Graduate School

June 2022

摘 要

牛传染性胸膜肺炎 (Contagious bovine pleuropneumonia, CBPP) 是由丝状支原体丝状亚种 (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, Mmm) 引起的一种感染性和高度传染性的牛呼吸道疾病。由于它能迅速传播并导致牲畜大量死亡而造成重大经济损失, 被世界动物卫生组织 (OIE) 列为 “A” 类传染病中唯一需要紧急报告的细菌性疾病。该病于 20 世纪末在我国成功消灭, 为保持我国 CBPP 无疫状态, 每年都在全国重点地区开展 CBPP 血清学监测。但目前我国尚无可用的国产化检测试剂, 一直依赖进口试剂盒, 来源受限且成本较高。为提高我国对 CBPP 的诊断和监测能力, 本研究拟建立一种特异、敏感、快速的 CBPP 竞争 ELISA 抗体检测方法, 为我国 CBPP 大规模监测和应急防控提供一种经济有效的技术手段。

基于本团队前期测序获得的 Mmm Ben-1 株的 5 个不同传代株的全基因组序列, 通过比较不同代次菌株的基因组差异, 筛选发现 13 个差异膜蛋白。本研究选取 Mmm 0071 (M0071) 蛋白作为研究对象, 将原核表达、纯化的可溶性重组蛋白 M0071 (rM0071) 作为免疫抗原, 筛选获得抗 Mmm 的特异性单克隆抗体 (Monoclonal antibody, MAb), 并以 HRP 标记的酶标单抗作为竞争抗体, 建立了一种特异的、敏感的检测 CBPP 抗体的竞争 ELISA 方法, 主要结果如下:

1. 抗 Mmm 特异性单克隆抗体的制备和筛选

成功构建 pET-32a-M0071 重组质粒, 并转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 获得可溶性表达, 将制备的具有良好免疫反应性的 rM0071 蛋白免疫 BALB/c 小鼠。细胞融合后, 通过间接 ELISA 方法筛选阳性克隆和有限稀释法亚克隆, 成功获得 1 株针对 rM0071 蛋白的特异性阳性杂交瘤细胞株, 将其分泌的抗体命名为 MAb 3C4A1。进一步制备腹水并纯化, 获得腹水单抗, 抗体效价为 $1 : 1.28 \times 10^5$ 。

2. 单克隆抗体 MAb 3C4A1 的鉴定

经鉴定 MAb 3C4A1 属于 IgG1 亚类、轻链为 κ 链。Western blot 分析显示该单抗仅与 Mmm 发生特异性反应, 而不与山羊支原体山羊肺炎亚种、丝状支原体山羊亚种、牛鼻支原体、无乳支原体、牛支原体、leachii 支原体以及牛 A 型巴氏杆菌等发生反应。将其应用于间接免疫荧光试验 (IFA) 可成功检测出感染 EBL 细胞的 Mmm, 表明该单抗具有良好的特异性和反应性, 可作为 Mmm 诊断的检测抗体。

3. 竞争 ELISA (cELISA) 抗体检测方法的建立及性能评估

通过条件优化, 建立了以 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 rM0071 蛋白作为包被抗原, 以 $1 : 2000$ 稀释的 HRP 标记 MAb 3C4A1 作为检测抗体的 CBPP 竞争 ELISA 抗体检测方法。通过检测已确定的 578 份临床牛血清, 确定该方法的 cut-off 值为 44.77%。检测经 IDEXX-cELISA 测定的 CBPP 阴性血清 (500 份) 和 CBPP 阳性血清 (70 份), 确定了该方法的特异性为 97.6%, 敏感性为 81.4%。该方法与其他 8 种常见的牛源性呼吸道疾病的标准阳性血清, 包括牛传染性鼻气管炎、牛病毒性腹泻、牛结核、牛副结核、牛支原体、无乳支原体、牛鼻支原体、leachii 支原体等无交叉反应。此外, 该方法对阳性血清的最小检出量为 $1 : 160$, 灵敏度较高; 批内、批间变异系数均小于 10%, 重复性良好。利用该方法对商品化 cELISA 试剂盒检出的 46 份阳性血清样品和 1362 份阴性血清样品进行检测, 阳性符合率为 80.43%, 阴性符合率为 94.13%, 总体符合率为 93.68%。

综上所述，本研究成功制备抗 Mmm 特异性单克隆抗体 MAb 3C4A1，并基于该单抗建立了检测 CBPP 抗体的竞争 ELISA 方法，该方法特异性良好，可为我国 CBPP 检测及流行病学监测提供一种经济有效的技术手段。

关键词：丝状支原体丝状亚种，M0071 蛋白，单克隆抗体，竞争 ELISA，抗体检测

Abstract

Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) is an infectious and highly contagious respiratory disease of cattle, caused by the *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony (Mmm). Because of its potential for rapid spread with resulting massive losses of livestock and thereby severe socioeconomic consequences, which is the only bacterial disease contained in the former list “A” diseases grouping of the World Organization for Animal Health (OIE) requiring urgent outbreak reporting. CBPP was successfully eradicated in China at the end of the 20th century. Serodiagnosis plays a key role in survey and control programs to combat CBPP. To maintain CBPP-free status, CBPP serological surveillance is carried out in China every year. However, no available diagnosis tools for CBPP survey at present as yet, and serodiagnosis of CBPP depends on imported reagents with high cost and limited source. In order to improve the diagnostic and monitoring capacity of CBPP, the purpose of this study was to develop a high sensitivity, specificity, and rapid competitive ELISA assay (cELISA) intended to fulfil the needs for effective mass screening of animals for CBPP. The cELISA would provide an economic and accurate diagnosis tools for large-scale monitoring, prevention and control of CBPP in China.

Based on the previous work in our laboratory, the complete genome sequences of five different generations strains of Mmm isolates Ben-1 were obtained. Systematic genetic, biochemical and antigenetic analysis of surface exposed lipoproteins of the aboved 5 genome sequences led to the identification of an antigenetically highly specific lipoprotein named Mmm 0071 (M0071) protein. Recombinant protein M0071 (rM0071) was expressed in *Escherichia coli* and purified, then used as an immunogen to product monoclonal antibodies (MAb) against Mmm. A competitive ELISA, using HRP-conjugated MAb detector antibody, was designed to detect antibodies to CBPP. The main results are as following:

1. Production and selection of specific MAbs against Mmm

The pET-32a-M0071 recombinant plasmid was successfully constructed and transformed into *E. coli* BL21(DE3) to obtain soluble expression, and the well immunoreactive rM0071 protein was prepared and immunized in BALB/c mice. The hybridoma culture supernatants were screened for the presence of a specific MAb against Mmm by indirect ELISA. Positive hybridomas were subcloned by limiting dilution at least three times to produvt hybridoma cells 3C4A1. MAb 3C4A1 were purified from mouse ascites using a protein G affinity column. The purified MAb titer was 1 : 1.28×10⁵.

2. Characterization of the MAb 3C4A1

MAb 3C4A1 belonged to IgG1, with having κ type light chain . In western blot analysis, MAb 3C4A1 specifically reacted with Mmm, while no reaction occurred with *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma leachii*, and Bovine Pasteurella type A. Immunofluorescence assays (IFA) was undertaken to estimate the reactivity of the MAb against Mmm. As shown in IFA, specific

staining was readily observed in Mmm-transfected EBL cells, but not in mock transfected cells. These data suggest that MAb 3C4A1 is high specificity and reactivity, which could be used as a detection antibody for the diagnostic method of Mmm.

3. Development and performance evaluation of the cELISA method

By optimizing the reaction conditions, a cELISA was developed on the basis of 2 µg/mL bound antigen and 1/2000 dilution of HRP-conjugate MAb 3C4A1. A total of 578 well-characterized bovine sera were used to determinate the cut-off. The resulting cut-off value of the percentage inhibition (PI) for results of the cELISA test was set at 44.77%. Bovine sera evaluated with cELISA (IDEXX) as CBPP -negative (500 sera) or -positive (70 sera) were tested with the cELISA in order to determine its sensitivity and specificity. Using this cut-off value, screening of negative bovine sera resulted in a specificity of 97.6%. With regard to the set of CBPP positive sera, it showed a sensitivity of 81.4%. The cross-reactivity of the cELISA was assessed with 8 antisera samples from each infectious group including Infectious Bovine Rhinotracheitis, Bovine Viral Diarrhea, Bovine Tuberculosis, Bovine Paratuberculosis, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma bovirhinis* and *Mycoplasma leachii*, respectively. The PI values for antisera against CBPP were significantly higher than 44.77%, while the PI values for antisera against the other pathogens ranged from 10.43% to 26.0% (Fig. 4-4), indicating that the cELISA was specific for antibodies against CBPP. Furthermore, the detectable limit was 1 : 160 dilution for cELISA. The repeatability of the cELISA was validated in a separate experiment, and the intra- and inter-assay reproducibility coefficients of variability (CVs) were less than 10%, showing relative stability. Performance of diagnostic accuracy of the cELISA was compared to commercial IDEXX cELISA. A total of 46 positive samples and 1362 negative samples were used to evaluate the diagnostic performance of the established cELISA. The results obtained for each serum sample in the cELISA and commercial IDEXX cELISA were compared. Overall, there was a high level of agreement between the cELISA and the IDEXX assay for the same serum samples. 80.43% of serum samples were positive in both the commercial kit and cELISA. 94.13% of serum samples were negative in both the commercial ELISA kit and cELISA, with a concordance of 93.68%.

In conclusion, this study prepare a specific MAb against Mmm, and have developed an cELISA based on the MAb to detect antibodies to CBPP, which shows to be a promising tool for the detection of CBPP. This cELISA provides an economic and accurate diagnosis tool for CBPP antibody detection and epidemiological surveillance, which is essential for CBPP control and eradication programs.

Keywords: *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, M0071 protein, Monoclonal antibody, cELISA, Antibody detection

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 丝状支原体丝状亚种的概述	1
1.2 牛传染性胸膜肺炎的研究进展	2
1.2.1 CBPP 病史与地理分布	2
1.2.2 CBPP 流行病学	2
1.2.3 CBPP 发病机制	3
1.3 牛传染性胸膜肺炎的诊断方法概述	3
1.3.1 CBPP 现场诊断	3
1.3.2 CBPP 实验室诊断	4
1.3.3 CBPP 鉴别诊断	5
1.4 抗 Mmm 单克隆抗体的研究进展	6
1.5 本研究的目的及意义	6
第二章 Mmm 0071 基因的克隆表达、纯化及鉴定	7
2.1 实验材料	7
2.1.1 质粒和血清	7
2.1.2 主要试剂	7
2.1.3 仪器设备	7
2.1.4 试剂、溶液配制	8
2.2 实验方法	8
2.2.1 pET-32a-M0071 重组质粒的构建	8
2.2.2 Mmm rM0071 蛋白原核诱导表达及纯化	9
2.2.3 Mmm rM0071 蛋白免疫反应性鉴定	10
2.3 结果	11
2.3.1 pET-32a-M0071 重组质粒的构建	11
2.3.2 Mmm rM0071 蛋白的可溶性分析及纯化鉴定	11
2.3.3 Mmm rM0071 蛋白的免疫反应性鉴定	12
2.4 讨论	13
第三章 抗 Mmm rM0071 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定	14
3.1 实验材料	14
3.1.1 菌株、细胞和实验动物	14
3.1.2 主要试剂	14
3.1.3 仪器设备	14
3.1.4 试剂、溶液配制	15
3.2 实验方法	16

3.2.1 小鼠免疫.....	16
3.2.2 间接 ELISA 筛选方法的建立.....	16
3.2.3 细胞融合.....	16
3.2.4 阳性杂交瘤细胞的筛选及亚克隆.....	18
3.2.5 阳性杂交瘤细胞株的稳定性鉴定.....	18
3.2.6 单克隆抗体的特异性鉴定.....	18
3.2.7 单克隆抗体的亚类鉴定.....	18
3.2.8 腹水的制备与单克隆抗体的纯化、HRP 标记.....	19
3.2.9 单克隆抗体的 IFA 检测.....	20
3.3 结果.....	20
3.3.1 间接 ELISA 方法的建立及阳性杂交瘤细胞株筛选、稳定性鉴定.....	20
3.3.2 MA b 3C4A1 的特异性测定.....	20
3.3.3 MA b 3C4A1 的亚类测定结果.....	21
3.3.4 腹水纯化的纯度鉴定.....	21
3.3.5 抗体效价测定结果.....	22
3.3.6 MA b 3C4A1 的 IFA 检测结果.....	23
3.3.7 HRP 标记抗体的质量鉴定.....	23
3.4 讨论.....	24
第四章 CBPP 竞争 ELISA 抗体检测方法的初步建立.....	25
4.1 实验材料.....	25
4.1.1 血清.....	25
4.1.2 主要试剂.....	25
4.1.3 仪器设备.....	25
4.1.4 试剂、溶液配制.....	25
4.2 实验方法.....	25
4.2.1 竞争 ELISA 检测方法的基本反应程序.....	25
4.2.2 抗原最适包被浓度和血清最佳稀释度的确定.....	26
4.2.3 酶标抗体最佳稀释度的确定.....	26
4.2.4 反应条件的进一步优化.....	26
4.2.5 临界值的判定.....	26
4.2.6 特异性分析.....	27
4.2.7 敏感性分析.....	27
4.2.8 重复性试验.....	27
4.2.9 符合率试验.....	27
4.3 结果.....	27
4.3.1 抗原最适包被浓度和血清最佳稀释度的确定.....	27
4.3.2 HRP-3C4A1 最佳稀释度的确定.....	28

4.3.3 最佳反应条件的确定.....	29
4.3.4 Cut-off 值的确定	31
4.3.5 特异性及交叉反应性试验分析结果.....	31
4.3.6 敏感性和最小检出量试验分析结果.....	32
4.3.7 重复性试验分析结果.....	33
4.3.8 符合率试验分析结果.....	33
4.4 讨论.....	34
第五章 结论.....	37
参考文献.....	38

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
AUC	Area under the curve	曲线下面积
bp	Base pair	碱基对
bTB	Bovine tuberculosis	牛结核
BVD	Bovine viral diarrhea	牛病毒性腹泻
CBPP	Contagious bovine pleuropneumonia	牛传染性胸膜肺炎
cELISA	Competitive enzyme linked immunosorbent assay	竞争酶联免疫吸附试验
CI	Confidence interval	置信区间
CV	Coefficient of variation	变异系数
EBL	Embryonic bovine lung	胎牛肺细胞
HAT	Hypoxanthine-aminopterin-thymidine	次黄嘌呤-氨基喋呤-胸腺嘧啶核苷
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HT	Hypoxanthine-thymidine	次黄嘌呤-胸腺嘧啶核苷
IBR	Infectious bovine rhinotracheitis	牛传染性鼻气管炎
IFA	Indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光试验
IPTG	Isopropyl- β -D thiogalactopyranoside	异丙基- β -D 硫代半乳糖苷
MAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
Mccp	<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>	山羊支原体山羊肺炎亚种
Mmc	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	丝状支原体山羊亚种
Mmm	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>	丝状支原体丝状亚种
NC	Nitrocellulose	硝酸纤维素
OD	Optical density	吸光度
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
pH	Potential of hydrogen	酸碱度
PI	Percentage inhibition	抑制率
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺

第一章 绪论

1.1 丝状支原体丝状亚种的概述

丝状支原体丝状亚种 (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, Mmm) 是引起牛传染性胸膜肺炎 (Contagious bovine pleuropneumonia, CBPP) 的病原体 (MWIRIGI et al., 2016), 属于支原体科 (Mycoplasmataceae), 支原体属 (*Mycoplasma*) 成员 (吴移谋 等, 2008)³。

与细菌不同的是, Mmm 无细胞壁, 它的最外层是荚膜、黏附结构与黏附相关蛋白, 内层为三层结构的细胞膜, 故其形态呈现高度多样化, 且易实现一种形态到另一种形态的迅速转化 (吴移谋 等, 2008²³⁷; NICHOLAS et al., 1995)。菌体在高倍显微镜下观察, 可看到丝状、环状、分枝状等多种形态, 最常见的是球状。菌体直径很小, 仅 125 nm ~ 250 nm, 能够通过 0.22 μm 的滤器 (董克亮 等, 2021)。Mmm 革兰氏染色呈阴性, 一般染料对菌体着色效果不是非常明显, 但着色效果较好的是吉姆萨和瑞氏 (李秀美, 2018)。其基因组为双链环状 DNA, 相较于其他原核微生物要小, 且 G+C 含量很低, 一般小于 30% (WESTBERG et al., 2004)。基于特定的生物学分子工具, 使 Mmm 菌群内部之间有了较明确的区分, 此为 Mmm 的流行病学研究提供了有用的遗传数据, 也进一步推动了该病原体生物学特性和毒力因子的研究 (POUMARAT et al., 1995; VILEI et al., 2004; MC AULIFFE et al., 2007; VARELA et al., 2010; DUPUY et al., 2012)。一些 Mmm 菌株已经完成了其全基因组的测序, 结果显示不同菌株基因组间的多样性很低 (LI et al., 2009)。例如, 分离株 Ben-1 的基因组与标准菌株 PG1 的总体同源性为 99.88%, Ben-1 株的基因组由 1 145 921 bp 的单个染色体组成, 共鉴定出 1043 个编码蛋白的基因, 其中有 335 个编码其他 Mmm 分离株中保守的假性蛋白 (LI et al., 2016)。

不同支原体的培养要求差距很大, 而 Mmm 对生长环境的要求比较苛刻。它可以分别通过固体和液体培养基来成功分离和培养, 一般是以肉汤浸出物 (如牛心浸液肉汤、马丁浸液肉汤) 作为基本培养基, 然后需要辅以酵母浸出物、10% ~ 20% 灭活马血清、胰蛋白胨、葡萄糖、固醇、丙酮酸钠等其他营养物质, 最适 pH 在 7.6 ~ 8.0 之间 (DI TEODORO et al., 2020); 固体培养基另需要加入 1% ~ 1.5% 低熔点琼脂糖。在实验室培养条件下, 一般通过在选择性培养基中加入青霉素 G 和醋酸铊, 可以从污染的样品中成功分离出 Mmm (郭元洪 等, 2017)。Mmm 在好氧和厌氧的条件下均能生长, 37°C 5% CO₂ 恒温箱培养为其最适生长环境。其在初次分离培养时, 菌体生长速度比较缓慢, 在液体培养基中, 偶而可见长丝状菌体生长, 以酚红作指示剂, 3 ~ 7 天才可观察到培养基颜色的变化; 菌体在固体培养基上接种 3 ~ 5 天后, 用放大镜观察仅能看到微小的菌落, 通常菌落很小 (直径 < 1 mm), 呈典型的“煎蛋”形状。Mmm 对一些常见的消毒剂以及紫外线、加热、酸碱环境等较敏感, 一些抗菌药物 (如: 大环内酯类抗生素、四环素类抗生素、氟喹诺酮类抗生素) 也可抑制其生长, 但 Mmm 对青霉素、醋酸铊、磺胺类抗生素等药物产生很高的耐药性 (SMITH et al., 1982; MITCHELL et al., 2013; 叶德成 等, 2018)。

1.2 牛传染性胸膜肺炎的研究进展

1.2.1 CBPP 病史与地理分布

CBPP 被认为是一种古老的疾病，但它的感染性和传染性在 18 世纪以前未被怀疑，1898 年 Nocard 和 Roux 从患病牛中分离出该病的病原体，之后逐渐得到证实 (NOCARD et al., 1990)。在很长一段时间，CBPP 的流行只局限于阿尔卑斯山脉中东部地区，也被认为是 CBPP 的发源地。由于牲畜贸易的增加，CBPP 蔓延到欧洲，并迅速遍及欧洲各国 (TER LAAK, 1992)。19 世纪开始，CBPP 迅速传入美国、澳大利亚以及非洲地区 (辛九庆, 2007)¹。自 20 世纪开始传入亚洲。CBPP 大规模的流行对于许多养牛大国无疑是一个巨大的灾难，造成的经济损失非常严重。在 20 世纪，通过禁止牛只的贸易往来、屠宰病牛、切断与感染牛的接触以及大规模疫苗接种等防治战略的实施，使得大多数西欧国家的 CBPP 得以根除。但在 19 世纪中期，该病在欧洲的伊比利亚半岛再次出现。随后，CBPP 又在一些地中海国家广泛流行，包括西班牙、法国、意大利和葡萄牙等，直至 1999 年 CBPP 在这些国家才最终被消灭，葡萄牙记录了最后一例病例 (REGALLA et al., 1996; VARELA et al., 2010)。

我国最早于 1910 年在内蒙古西林河上游一带发现该病，在 1919 年从澳大利亚进口奶牛时将 CBPP 正式传入我国上海地区，随后在全国传播流行，给我国的经济造成重大损失 (吴移谋 等, 2008)²³⁷。我国先后研制出有效的兔化弱毒疫苗以及兔化绵羊化弱毒疫苗，并结合检疫、隔离、消毒、扑杀等严格的防治措施，使 CBPP 的流行得到了明显的控制 (吴庭训, 2005)。我国经过几十年的努力，于 2011 年 5 月被世界动物卫生组织 (OIE) 认证为无 CBPP 的国家 (XIN et al., 2012)。

目前，CBPP 在撒哈拉以南的非洲许多国家流行 (MUUKA et al., 2013)，而它在亚洲的存在我们又知之甚少，其中只有印度和中国已正式摆脱了 CBPP，许多其他亚洲国家还没有报道该种疾病 (辛九庆 等, 2003)。因此，CBPP 仍存在较大传播风险，像口蹄疫一样被认为是牲畜贸易面临的最严重的越境威胁，一旦重新传入将会造成巨大损失。

1.2.2 CBPP 流行病学

饲养牛和野生的牛均被证明对 Mmm 易感，包括黄牛、牦牛、奶牛和犏牛 (李秀美, 2018)。该病的传染源是病牛和带菌牛，而且大多数患病牛在康复后的很长一段时间仍然携带病原体，随时可感染健康牛只 (辛九庆, 2007)⁴。

在自然条件下，该病传播的最有效途径依赖于感染牛 (临床感染个体或者亚临床携带者) 与健康牛之间的长期直接接触，感染牛呼出的气体或者咳嗽带出的飞沫常带有许多病原体，这些病原体一旦被健康牛只经呼吸道吸入便会引发感染 (DI TEODORO et al., 2020)。另外，该病也可通过受污染的牧场、水源、饲料、垫草、粪便等间接传播，经胎盘感染垂直传播，但这两种传播的影响并不是很大。因此，在无 CBPP 的地区引入 Mmm 感染的主要风险取决于受感染牛只的贸易和流动 (王夫天, 2018)。

本病多呈散发，四季均可发生。影响该病流行和发病的因素主要包括：病原菌毒力的强弱，牛群的健康水平与易感性高低，饲养环境的好坏，管理程度的细致与否，气候和外界环境的变化等，在实际养殖生产中均可影响牲畜的感染和发病 (吴移谋 等, 2008)²³⁸。

1.2.3 CBPP 发病机制

病原菌以不同的途径侵入动物体内，所致动物发生病变也不一样。例如皮下或静脉接种该病原，不会引起典型的胸膜炎或胸膜肺炎，主要表现为皮下组织炎症和关节炎。临床感染的 CBPP 病例大多数是通过呼吸道吸入病原体，其进入体内停留于气管、支气管黏膜上继而引发多个组织部位的病变（徐洪伟, 2019; SACCHINI et al., 2020）。但由于目前暂无合适的动物模型，而且难以在其自然宿主中进行实验复制，所以对 CBPP 发病机制的了解很局限。近些年，对其体外模型的研究发现其发病机制可包括几个相互联系的过程：一是粘附和侵袭宿主的细胞和组织。Mmm 与呼吸道细胞的粘附是致病的第一步，这可以保证它在宿主体内成功定植。细支气管和肺泡内的非纤毛细胞被认为是 Mmm 最早的感染靶点。随后 Mmm 也可侵入血液和淋巴管，黏附于内皮细胞上（RAZIN et al., 1998; PILO et al., 2005）；二是宿主细胞损伤。半乳糖作为 Mmm 主要的毒力因子，可引起宿主细胞损伤（BUTTERY et al., 1976）。另外，Mmm 也可通过甘油代谢产生活性氧对宿主细胞造成损伤（PILO et al., 2007; KOPPEL et al., 1984）；三是 Mmm 与炎症反应。肺泡巨噬细胞作为第一道最重要防线以抵御下呼吸道微生物感染，在受到 Mmm 体外刺激后，可以产生促炎或抗炎细胞因子以参与 Mmm 感染肺的炎症反应（JUNGI et al., 1996）。四是免疫介导的 CBPP 发病机制。而有关细胞免疫反应和体液免疫反应在 CBPP 发病机制中的作用仍一直存在争议，无法做出准确判断（SACCHINI et al., 2011; NIANG et al., 2006; ABDO et al., 1998）。一项研究发现针对脂蛋白 LppQ N 末端的抗体可引起免疫复合物的沉积和肾小球肾炎的发生，从而支持了免疫反应介导 CBPP 发病机制（MULONGO et al., 2015）。

1.3 牛传染性胸膜肺炎的诊断方法概述

对于典型的 CBPP 病例，结合流行病学、临床症状和剖检病理变化就可对病牛做出初步的诊断；而部分牛群感染 CBPP 之后，无明显的临床症状和病理变化出现，称为非典型的 CBPP，必须借助实验室诊断技术进行确诊（DEDIEU et al., 1996）。

1.3.1 CBPP 现场诊断

1.3.1.1 临床诊断

CBPP 感染的潜伏期平均在 1~4 周左右，但受个体或环境影响差异显著，短则 7 天，长则可达数月。（1）急性型：通常发生在流行初期，病牛最先表现为高热（体温高达 40~42℃），严重呼吸困难，不愿行动或下卧，呈现腹式呼吸；随着病情发展严重，病牛表现为呼吸急促，咳嗽弱而频繁，胸痛并伴有呻吟声，叩诊可引起病牛疼痛，听诊有湿性啰音，胸前部及肉垂皮下水肿，鼻分泌液表现为浆液性至化脓性，口腔周围积聚泡沫状和丝状的唾液等（BYGRAVE et al., 1968; 贾博, 2021）。（2）亚急性型：其症状与急性型相似，但表现较轻。病牛表现为食欲不振，体温较高，慢性短咳，呼吸加快，活动困难，并常有便秘或腹泻等（吴移谋 等, 2008）²³⁹。（3）慢性型：病牛体态消瘦，食欲时好时差，呈一过性发热，偶发干性咳嗽（袁敏明 等, 2021）。

1.3.1.2 病理诊断

剖检病牛，胸腔内有积液，内脏和胸膜壁层上有大量纤维性蛋白沉积，通常很厚，颜色呈淡

黄色，类似于“煎蛋卷”外观 (DI TEODORO et al., 2020)。病肺质地坚硬、充血，肺炎病灶大小不一，部分瘢痕化。肺实质发生不同时期肝样变样，切面“大理石样”，有大面积且边界清楚的坏死灶 (高明东, 2017)。气管、支气管和纵膈的一部分淋巴结表现肿大，水肿，偶尔也会出现小结节 (SCANZIANI et al., 1997)。心包膜变厚、出血，心包内有积液。肾脏有明显的梗死灶 (GRIECO et al., 2001)。肺病变部与胸膜壁之间有强烈的纤维性粘连 (MBULU et al., 2004)。

1.3.2 CBPP 实验室诊断

1.3.2.1 病原的分离与鉴定

病原分离鉴定是 CBPP 诊断技术的金标准，但通常需结合 PCR 检测，尤其在疫情暴发时期对于快速诊断具有重要参考价值 (ANYIKA et al., 2021)。Mmm 可从活体动物的鼻拭子或分泌物中分离出来；或者尸检时，取病牛的胸腔积液、病变肺脏组织、呼吸道淋巴结组织等病料，接种于支原体培养基上培养。Mmm 培养的生长周期较长，培养过程中易被其他细菌污染，而且由于病原的特殊性，它的培养需要更高要求的培养空间和安全环境。在实际应用中，通常样本采集地与实验室存在一定距离，也要求全程低温或冷冻运送以保证菌体活力 (TRICHARD et al., 1989)。

1.3.2.2 PCR 检测

聚合酶链式反应 (PCR) 检测已成为 CBPP 诊断的有效手段，检测的灵敏度高、特异性强且非常容易操作。众多研究已证实，利用特异性引物可以扩增出针对 Mmm 不同大小的特异性 DNA 片段 (BASHIRUDDIN et al., 1994; 辛九庆 等, 2002; SCHNEE et al., 2011; CHURCHWARD et al., 2012)。而且检测样品范围广泛，包括动物组织、血液、关节液、细胞、拭子、培养菌液等 (BASHIRUDDIN et al., 1999)。但该方法需要特殊的实验室仪器设备，对实验条件以及操作人员的要求均较高，无法满足养殖场或屠宰场的现场快速诊断需要。同时，对于检测的病料样本需要经过复杂的预处理，难以满足高通量检测的需求。其他一些实验结果显示，该方法也容易出现假阳性或假阴性的结果，因此在样品处理方法上需要进一步改进。

1.3.2.3 血清学诊断

已报道 CBPP 的血清学检测方法有很多，每种方法都显示其自身不同的优越性和局限性，迄今为止没有任何一种血清学试验能够检测出所有受感染的动物 (MAROBELA-RABOROKGWE et al., 2003)。

补体结合试验 (CFT) 是传统的血清学试验，在发生 CBPP 的国家一直被广泛使用，具有很高的特异性，但敏感性较差。处于疾病早期的急性病例，CFT 几乎可以全部检测到，而很少能检出处于慢性阶段的病例 (MUUKA et al., 2011)。Mmm 与支原体属的其他成员之间也可能发生交叉感染，从而导致 CFT 存在假阳性结果 (REGALLA, 1995)。目前，CFT 多采用微量法，更加节省抗原，也更适用于疫病普查中大批量血清样本的检测，但其操作仍较困难，实验人员需经严格培训 (王栋 等, 1991)。

琼脂扩散试验 (AGP) 操作简便，无严格的试验条件且不需要特殊的仪器设备，一般实验人员均可操作，但该方法特异性、敏感性均较差，目前临床诊断中基本不采用该方法。

玻片凝集试验 (SAT) 和微量凝集试验 (MA) (吴裕祥 等, 1988; 张德昆 等, 1992) 均适合于在野外条件下疫情突发的初步诊断，在非常短的时间内即可检测出结果，同时可开展大量血

清样本的检测。但此两种方法均容易有假阳性反应出现，且以肉眼观察结果，易导致判定结果不准确。

被动血凝抑制试验（PHA）实用性比较好，与 CFT 相比也具有更高的敏感性，但会存在一些假阳性结果，尤其是对于非疫区的筛选检查。

ELISA 已成为现阶段检测 CBPP 的主要技术手段，相较于其他血清学检测方法，ELISA 显现出高特异和高敏感的检测优点，而且它的操作方法相对简单、检测样品量大、实验时间短。在 1979 年 Onoviran 和 Taylor-Robinson 首次报道了 CBPP 的酶联免疫吸附试验，随后关于 ELISA 检测方法的研究也越来越多（ONOVIRAN et al., 1979）。国外研究学者通过对 Mmm 脂蛋白 LppQ 结构和免疫原性的研究，从而发现了 LppQ N 末端有作为一种理想的 CBPP 诊断抗原的潜能（BONVIN-KLOTZ et al., 2008; ABDON et al., 2000）。Bruderer 等（2002）和辛九庆等（2006）分别利用 Mmm 不同菌株的 LppQ N 末端重组蛋白建立了间接 ELISA 方法，此方法的特异性和敏感性均显示良好，也证实了前期研究的结论。本研究团队也已建立了基于膜蛋白 rP35 和 rP0308 的间接 ELISA 抗体检测方法，其特异性良好，但存在敏感性不足的特点（闫磊 等, 2019; 郝文君 等, 2020）。因此，仍需挖掘更广谱的 Mmm 诊断靶标和研制更精准的诊断方法。另外，基于单克隆抗体的 cELISA 方法显示出了极大的优越性，与 CFT 相比，cELISA 对于临床慢性病例的检测更敏感，而且对于非疫区或未感染牛的检测特异性更强，但此两种方法仅被推荐用于畜群水平的检测（郝文君 等, 2020; BROCCHI et al., 1993）。

1.3.2.4 免疫学诊断

根据 OIE“陆生动物诊断和疫苗手册”，CBPP 可通过免疫荧光试验（IFA）（TRICHARD et al., 1989）、圆片生长抑制试验（DGIT）、琼脂凝胶免疫扩散试验（AGID）和免疫组织化学试验（IHC）等多种免疫学试验诊断，样品来源可包括其病原培养物或感染的组织、器官组织液（世界动物卫生组织, 2012）。另外，大多数免疫学试验使用的是抗 Mmm 的高免血清，其质量决定了试验的特异性（辛九庆, 2007）¹¹。因 Mmm 与丝状支原体家族的其他成员亲缘关系很近，而且 Mmm 不同菌株的多肽谱表现出极高的相似性，因此常常存在交叉反应，有时会出现假阳性（AYE et al., 2015）。其中 IHC 方法是对 CBPP 诊断的补充，它在慢性病例、疑似抗生素治疗干扰 Mmm 分离的病例，尤其是在难以分离 Mmm 的肾炎的诊断中具有重要作用（GRIECO et al., 2001）。

1.3.3 CBPP 鉴别诊断

CBPP 的临床症状在不同感染阶段表现也有不同，其与一些牛呼吸道疾病比如：牛巴氏杆菌病、大叶性肺炎、创伤性心包炎、牛结核、化脓性肺炎和牛支原体感染等的临床表现极为相似，因此临床中必须考虑鉴别诊断。其中，急性型 CBPP 与牛巴氏杆菌病和大叶性肺炎相似，应注意肺不同程度肝样变和大理石样的外观、肺小叶间质和淋巴管的组织学表现等（GRIFFIN, 2010; 吴移谋 等, 2008²⁴¹）；创伤性心包炎在临床上有类似 CBPP 的胸部知觉过敏和呼吸障碍；慢性型 CBPP 与牛结核病和化脓性肺炎容易相混淆，主要表现在坏死性结节（陈海东, 2019; MILNE et al., 2020）；牛支原体肺炎主要表现在犊牛，通常肺部病变不明显，应注意区分（MAUNSELL et al., 2011）。

1.4 抗 Mmm 单克隆抗体的研究进展

国外学者 Rodriguez 等（1996）成功制备了抗 Mmm 的 4 株单克隆抗体 3H12、6D11、2A3 和 5E5，并以抗原夹心 ELISA 方法研究了它们区分支原体菌群的特异性，结果显示仅 MAb 5E5 与支原体簇的其他成员之间发生交叉反应，其余 3 株单抗均显示对 Mmm 的高度特异性。Brooks 等（2009）也研制了针对 Mmm 的特异性单克隆抗体 MAb 6E3，将它与 Rodriguez 等（1996）制备的 MAb 3H12 结合应用于双抗夹心 ELISA 检测方法，也同样保留了较好的特异性，而且提高了检测的灵敏度。Le Goff 等（1998）利用针对 Mmm 特异的单克隆抗体 MAb 117/5，建立了一种 cELISA 方法，cut-off 值为 50%，其与 CFT 相比，特异性相似，但表现了更好的敏感性，而且它的抗体滴度持续期更长，适用于没有 CBPP 感染地区的检测，它是目前国际贸易指定的血清学检测方法，并由美国 IDEXX 公司进行商品化生产。Luciani 等（2016）使用单克隆抗体 MAb 3G10E7 代替 Mmm 兔的高免血清对 IHC 技术进行了优化，结果显示 MAb 3G10E7 减少了免疫组化背景染色，而且避免了与牛支原体的交叉反应。

1.5 本研究的目的及意义

CBPP 属于 OIE 规定的须报告传染病，一旦发生具有极高的发病率和死亡率。我国虽然已成功消灭 CBPP，但由于我国周边国家如巴基斯坦仍然有 8% 的流行率，以及活牛非法入境数目较大等原因，CBPP 跨境传入我国的风险日益增加。CBPP 一旦重新传入，将对我国养牛业生产带来毁灭性的打击。本实验室每年承担农业农村部下达的在全国范围内开展 CBPP 流行病学监测的任务，但我国尚没有国产化的抗体检测试剂盒，检测试剂依赖进口，不能满足我国开展大规模监测及应急防控的要求。因此，亟需建立一种特异、敏感的血清学检测方法，为我国开展 CBPP 流行病学监测和口岸检疫提供有效技术手段。

本研究制备的抗丝状支原体丝状亚种的特异性单克隆抗体，具有良好的特异性和阻断活性，以其为检测抗体建立了一种敏感、特异的竞争 ELISA 抗体检测方法，不仅为我国 CBPP 大规模血清学检测和有效防控提供了技术手段，也为后续商品化试剂盒的开发奠定基础。

第二章 Mmm 0071 基因的克隆表达、纯化及鉴定

根据本实验室前期测序 Mmm 分离株 Ben-1 的 5 个不同传代株的全基因组序列，比较不同代次菌株的基因组差异，通过生物信息学分析以及文献检索，初步筛选到 13 个 Mmm 差异膜蛋白。基于团队前期研究结果选取膜蛋白 Mmm 0071 (M0071) 用于本研究，借助大肠杆菌原核表达系统，制备了免疫反应性良好的重组蛋白 M0071 (rM0071)，为本研究后续制备 Mmm 特异性单抗提供了基础材料。

2.1 实验材料

2.1.1 质粒和血清

- (1) 质粒：原核表达载体 pET-32a(+)由动物支原体创新团队（以下简称本实验室）保存。
- (2) 血清：CBPP 阳性牛血清、阴性牛血清均保存于本实验室。

2.1.2 主要试剂

- (1) 内切酶 *Bam*H I和 *Sal* I，购自 NEB 公司；
- (2) T4 DNA Ligase，购自宝生物公司；
- (3) 2×Taq PCR Mixture，购自博奥龙公司；
- (4) 感受态细胞 DH5 α 及 BL21(DE3)，购自 Vazyme 公司；
- (5) 质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒，购自 OMEGA 公司；
- (6) BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL 化学发光试剂盒，购自碧云天公司；
- (7) Ni-NTA 纯化树脂，购自 GE 公司；
- (8) 硝酸纤维素 (NC) 膜，购自 PALL 公司；
- (9) 10 kD 规格超滤管，购自 Merck 公司；
- (10) HRP-兔抗牛 IgG，购自 Sigma 公司。

2.1.3 仪器设备

- (1) 微型离心机 (MINI-10K+C) MULAB
- (2) 小型振荡器 (MX-S) SCILOGEX
- (3) 小型离心机 (5424R) Eppendorf
- (4) 磁力搅拌器 (MS-PA) 国产 (大龙)
- (5) 超纯水仪 (GenPure Pro UV/UF) Thermo scientific
- (6) 旋转混匀仪 (TR-01) SilentShake
- (7) 超微量紫外分光光度计 (SpectraMax QuickDrop) MD
- (8) 超声波破碎仪 (VCX-750/130) SONICS
- (9) 垂直低温台式离心机 (Allegra X-30R) BECKMAN COULTER
- (10) 梯度 PCR 仪 (C1000 Touch™ Thermal Cycler) BIO-RAD

- (11) 核酸电泳仪 (DYY-7C) 国产 (六一)
- (12) 凝胶成像分析仪 (JS-2000) 国产 (培清)
- (13) 蛋白电泳仪 (MINIVE) Amersham Biosciences
- (14) 垂直电泳槽 (Mini P-4) Cavoy
- (15) 台式恒温振荡器 (THZ-D) 国产 (培英)
- (16) 细菌间生物安全柜 (HFsafe-1500) Heal Force
- (17) 小型摇床 (SLK-03000-S) SCILOGEX
- (18) 通用型半干转膜仪 (Trans-SD) Cavoy
- (19) 电热恒温水槽 (DK-8D) 国产 (精宏)
- (20) 电热恒温培养箱 (DHP-9082) Blue Pard
- (21) 化学发光成像系统 (FluorChem R FR0493) ProteinSimple

2.1.4 试剂、溶液配制

(1) Amp 抗生素 (100 mg/mL): 称量 1 g 氨苄青霉素粉末加入到 10 mL 无菌水中, 溶解后 0.22 μm 滤器过滤。

(2) IPTG 诱导剂 (100 mM): 称量 1.1915 g 异丙基- β -D 硫代半乳糖苷粉末加入到 50 mL 无菌水中, 溶解后 0.22 μm 滤器过滤。

(3) LB 液体培养基: 称量 5 g 酵母提取物、10 g 胰蛋白胍、10 g 氯化钠, 溶解于 1 L 去离子水中, 高压灭菌。

(4) LB 固体培养基: 称量 40 g LB 琼脂粉末加入到 1 L 去离子水中, 高压灭菌, 待温度接近室温以 1 : 1000 加入 Amp 抗生素后倒入细菌培养皿, 冷却并紫外照射 30 min 左右。

(5) 1% 琼脂糖凝胶: 称量 4 g 琼脂糖加入到 400 mL 1 \times TAE 缓冲液中, 使用微波炉高火加热直至琼脂糖完全融化 (沸腾起来), 放置室温冷却, 待温度达到 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右按照每 100 mL 加入 8 μL 溴化乙锭, 然后放置于 56 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱。

(6) 蛋白纯化用不同浓度咪唑

咪唑稀释液 (pH 7.4): 称量 3.1202 g 二水合磷酸二氢钠、7.1628 g 十二水磷酸氢二钠、29.22 g 氯化钠, 溶解于 1 L 去离子水中, 调节 pH 至 7.4, 用 0.45 μm 滤器过滤。

平衡液 (20 mM, pH 7.4): 称量 1.3615 g 咪唑, 溶解于 1 L 咪唑稀释液中。

Binding buffer (40 mM, pH 7.4): 称量 2.7231 g 咪唑, 溶解于 1 L 咪唑稀释液中。

Elution buffer (250 mM, pH 7.4): 称量 17.02 g 咪唑, 溶解于 1 L 咪唑稀释液中。

2.2 实验方法

2.2.1 pET-32a-M0071 重组质粒的构建

Mmm 0071 基因由北京华大基因科技有限公司进行密码子优化、合成并亚克隆至 pUC 57 载体转入到大肠杆菌 DH5 α 保存。将其按照 1 : 100 比例接种于 5 mL 新鲜 LB (含终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp⁺) 培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 振荡培养 10 h, 再扩大转接 20 mL 培养 16 h 以上, 使用质

粒小提试剂盒提取质粒。pET-32a(+)载体也同样进行质粒的提取。使用超微量紫外分光光度计测定质粒纯度 (A260 / A280) 和浓度, -20°C 储存备用。

将提取的 pUC 57-M0071 质粒和 pET-32a(+)质粒分别经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切, 酶切体系在 37°C 水浴反应 3 ~ 4 h。然后, 将酶切产物进行 1% 核酸电泳分离后, 置紫外透射仪中, 用手术刀切取目的片段并收集于干净的 EP 管中, 使用试剂盒进行胶回收, 并测定纯度和浓度。利用 T4 DNA 连接酶将 M0071 目的基因连接到 pET-32a(+)上, 连接体系在 16°C 过夜。

(1) 酶切体系为 120 μ L:

质粒	6 μ g
<i>Bam</i> H I	6 μ L
<i>Sal</i> I	6 μ L
NEBuffer	12 μ L
ddH ₂ O	补至 120 μ L

(2) 连接体系为 10 μ L:

T4 DNA Ligase	1 μ L
10 \times T4 DNA Ligase Buffer	2 μ L
pET-32a(+)载体片段	100 ng
M0071 基因片段	150 ng
ddH ₂ O	补至 10 μ L

将连接产物转化 DH5 α , 即: 提前准备一个冰盒, 取出一支 DH5 α 细胞置冰上融化后加入 10 μ L 上述连接产物; 先将其置冰上冷浴 30 min, 再经 42°C 热激 90 s 后立即取出置冰上再次冷却 2 ~ 3 min; 然后, 加入 900 μ L 左右的无抗性 LB 培养基, 振荡培养 1 h; 菌液经 5000 g 离心弃掉上层培养基, 余留 200 μ L 用于重悬菌体并混匀, 最后取一定体积重悬菌液涂布在 LB 琼脂平板 (Amp⁺) 上。37°C 倒置平板培养过夜。

第二天可看到平板上生长有大小均匀的菌落, 挑取 3 ~ 5 个做菌落 PCR 鉴定, 标记清楚每个菌落的位置和序号, 以便后续比对重新挑单。根据 PCR 鉴定的结果, 重新挑取鉴定为阳性的克隆接种在小量 LB 液体培养基 (Amp⁺) 培养, 待其培养 10 h 左右再扩大转接 10 mL 培养 16 h 以上, 提取质粒, 并进行 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切鉴定, 同时送长春库美生物科技有限公司测序鉴定。将正确的克隆甘油保种, -80°C 保存。

(3) 菌落 PCR 反应体系为 20 μ L:

2 \times Taq PCR Mixture	10 μ L
ddH ₂ O	8 μ L
Primer-F/R	各 1 μ L
模板	单菌落

2.2.2 Mmm rM0071 蛋白原核诱导表达及纯化

2.2.2.1 rM0071 蛋白的原核诱导表达

取 1 μ L 重组质粒 pET-32a-M0071 转化至 BL21(DE3)表达菌中 (参照 2.2.1 中描述的化学转化

方法)。挑取单个克隆接种于 5 mL LB (Amp⁺) 培养基中扩大培养, 37°C 200 r/min 振荡培养 10 h。然后, 以 1% 的比例小量转接 10 mL, 先在 37°C 培养至菌体对数生长期 (即 OD_{600nm} 值在 0.4 ~ 0.6 之间), 约 1.5 ~ 2 h, 然后加入 0.1 mmol/L 的 IPTG, 并在 16°C 120 r/min 培养条件下诱导过夜。本试验以相同条件诱导的 pET-32a 载体和不加 IPTG 诱导的全菌作为对照组。

诱导培养结束后, 收集菌液于 4°C 8000 rpm 离心 5 min, 用 PBS 洗涤 2 次, 洗涤后的菌体沉淀用 1 mL PBS 重悬进行超声破碎。将超声破碎后的全菌液于 4°C 8000 rpm 离心 15 min 分离超声后上清和沉淀, 吸取上清于另一干净 EP 管中, 并用 1 mL PBS 重悬超声后的沉淀。然后各取 40 μL 收集的全菌、上清、沉淀等样品, 加入 10 μL 蛋白上样缓冲液 (5×) 煮沸 10 min 变性, 将它们同时进行 SDS-PAGE 电泳, 并用考马斯亮蓝染色观察。

2.2.2.2 rM0071 蛋白的镍柱亲和层析纯化

参照 2.2.2.1 的方法大量诱导 500 mL 菌液, rM0071 蛋白的镍柱亲和层析纯化方法如下:

(1) 按照 2.2.2.1 描述方法收集诱导后菌体, 进行超声破碎。收集超声破碎后菌液上清, 用 0.45 μm 滤器过滤;

(2) 取 1 mL Ni-NTA His 标签的树脂, 1000 rpm 离心 2 min, 弃去上层保护液, 再用 20 mM 咪唑或 PBS 洗涤一次, 将洗涤后树脂加入到过滤后的超声上清中, 置于旋转混匀器上 4°C 结合过夜;

(3) 准备一个干净的空的重力流层析柱, 将结合液加入柱中, 收集流穿液反复挂柱 2 ~ 3 遍;

(4) 洗杂: 用 40 mM 咪唑对树脂上非特异性吸附或结合的杂蛋白进行洗涤, 洗涤 300 mL 体积;

(5) 洗脱: 用 250 mM 咪唑对树脂上结合的目的蛋白进行洗脱, 洗脱 15 mL 体积;

(6) 超滤浓缩: 使用 10 kD 超滤管对收集的洗脱液进一步超滤浓缩, 4°C 4000 rpm 离心 30 min, 弃去外管中滤过液, 再用 0.22 μm 过滤的 PBS 反复超滤 2 ~ 3 次, 超滤管内管中剩余的最终液体即为纯化得到的 rM0071 蛋白;

(7) 浓度测定与保存: 测定纯化 rM0071 蛋白浓度 (BCA 蛋白浓度测定试剂盒), 标记并小量分装, -80°C 冻存备用。

2.2.3 Mmm rM0071 蛋白免疫反应性鉴定

利用 Western blot 试验鉴定 rM0071 蛋白的免疫反应性, 即: 先将 rM0071 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后转印至 NC 膜上; 转膜结束, 将膜置于干净的小黑盒中, 加入 20 mL 5% 鱼明胶, 室温封闭 2 h; 将 CBPP 阳性牛血清、阴性牛血清分别作 1 : 100 稀释, 作为一抗孵育, 置于 4°C 反应 16 h; 加入 1 : 8000 稀释的 HRP-兔抗牛 IgG, 作为二抗孵育, 室温反应 1 h。上述每一步骤结束均用 PBST 洗涤 3 次, 10 min/次。最后, 采用 ECL 显色方法, 借助化学发光成像系统曝光观察结果。

2.3 结果

2.3.1 pET-32a-M0071 重组质粒的构建

利用 *Bam*H I 和 *Sal* I 内切酶将合成的 Mmm 0071 基因酶切回收后，克隆于 pET-32a(+) 载体，转化至 DH5 α ，提取阳性克隆的质粒进行双酶切鉴定，鉴定结果如图 2-1 所示，获得约 5900 bp 的载体片段和约 1500 bp 的基因片段，与预期相符。基因测序结果显示插入的目的序列与 Ben-1 分离株的 M0071 基因序列也完全一致，成功构建重组质粒 pET-32a-M0071。

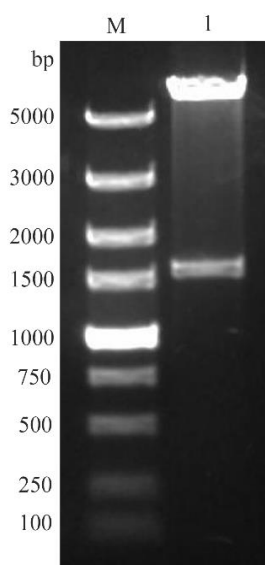


图 2-1 重组质粒 pET-32a-M0071 的双酶切鉴定

Fig. 2-1 Double digestion identification of recombinant plasmid pET-32a-M0071

M. DL5000 DNA 相对分子质量标准；1. 重组质粒 pET-32a-M0071 的 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切产物

M. the DNA molecular weight standard DL5000; 1. Products from recombinant plasmid pET-32a-M0071 digested with *Bam*H I and *Sal* I

2.3.2 Mmm rM0071 蛋白的可溶性分析及纯化鉴定

通过 SDS-PAGE 分析 rM0071 蛋白的表达形式和纯度，结果如图 2-2 所示，rM0071 蛋白在上清中获得大量表达，且在约 100 kD 位置出现目的条带（图 2-2，泳道 4）。rM0071 蛋白经镍柱亲和层析纯化后，有效除去了其他杂蛋白，目的条带单一，纯度较高（图 2-2，泳道 6）。

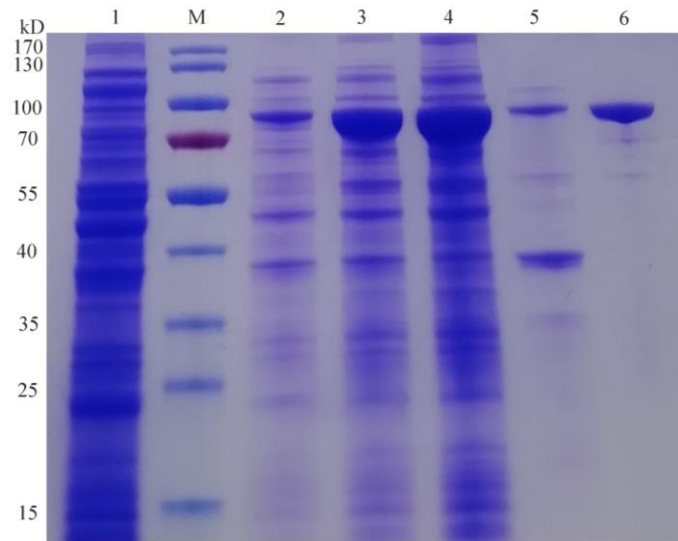


图 2-2 rM0071 蛋白诱导表达及纯化鉴定

Fig. 2-2 Induced expression and purification of recombinant protein M0071

M. 蛋白质相对分子质量标准；1. 诱导的 pET-32a 空载体；2. 未诱导全菌；3. 诱导全菌；4. 诱导重组菌裂解上清；5. 诱导重组菌裂解沉淀；6. 纯化的 rM0071 蛋白

M. Protein molecular weight marker; 1. pET-32a empty carrier induced by IPTG; 2. The whole bacteria without IPTG induction; 3. IPTG induced whole bacteria; 4. IPTG induced recombinant bacteria lysate supernatant; 5. IPTG induced recombinant bacteria lysate precipitation; 6. Purified rM0071 protein

2.3.3 Mmm rM0071 蛋白的免疫反应性鉴定

如图 2-3 所示，rM0071 蛋白与 CBPP 阳性牛血清可以发生特异性反应，在约 100 kD 位置有特异性条带（图 2-3，泳道 1），而与阴性血清无特异性条带，不发生反应（图 2-3，泳道 2）。

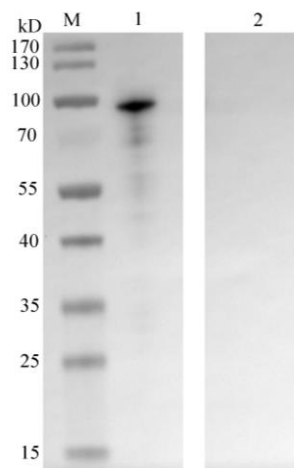


图 2-3 rM0071 蛋白免疫反应性鉴定

Fig. 2-3 Immune reactivity detection of recombinant protein M0071

M. 蛋白质相对分子质量标准；1. CBPP 阳性牛血清；2. CBPP 阴性牛血清

M. Protein molecular weight marker; 1. CBPP positive bovine sera; 2. CBPP negative bovine sera

2.4 讨论

支原体缺少细胞壁，其表面的脂蛋白可以诱导宿主产生强烈的免疫反应，被认为是血清诊断的重要特异性靶标 (JAN et al., 1996)。目前，Mmm 的一些脂蛋白如 LppA、LppB、LppC、LppQ 及可变表面蛋白 Vmm 等已被详细描述，表明具有作为诊断抗原的潜能 (DEDIEU et al., 2010; VILEI et al., 2000; PILO et al., 2003; ABDO et al., 2000; PERSSON et al., 2002)。但是，许多基于这些优势抗原建立的检测方法由于特异性和敏感性的不足，多数处于实验室研究阶段，后续均未发现临床应用的相关报道。而特异性诊断靶标是影响诊断技术敏感性、特异性和适应性的主要条件，因此仍需挖掘更广谱特异的 Mmm 诊断靶标。

CBPP 于 1919 年从澳大利亚进口奶牛时传入我国上海地区 (吴移谋 等, 2008)²³⁷，随后在全国大范围传播流行，造成重大的损失。中国农业科学院哈尔滨兽医研究所主持研制的 Ben-1 兔化弱毒疫苗的大规模应用成功控制了 CBPP 的流行。研发人员采用独特的致弱路线，对 Ben-1 强毒株进行弱毒化，获得了弱毒疫苗株 Ben-181，该疫苗可诱导 27 个月免疫保护期，免疫保护率达 100% (Xin et al., 2012)。通过使用 Ben-181 疫苗，中国已根除 CBPP，并被 OIE 正式认证为无 CBPP 国家。为鉴定 Mmm 毒力和免疫原性相关的基因，本实验室前期对 Mmm Ben-1 株的 5 个不同传代株进行了全基因组测序并进行比较分析，发现了一些免疫毒力相关的差异基因 (LI et al., 2016)，在此基础上，本研究选取 Mmm 0071 基因编码的 M0071 蛋白作为突破点，探究其作为诊断抗原的潜能。

M0071 基因编码赖氨酸-tRNA 合成酶 (Lysine-tRNA ligase, LysS)，其属于 II 类氨基酰 tRNA 合成酶的家族成员 (Aminoacyl-tRNA synthetases, ARSs)。ARSs 通常被认为是蛋白质合成的“管家”，其主要功能是催化氨基酸与它们同源的转运核糖核酸 (tRNAs) 相连接，保证蛋白质翻译的准确性 (NIE et al., 2019)。ARSs 除了参与生物体蛋白质合成及多种生理病理过程，其在感染性疾病中也发挥着重要作用，比如肠炎沙门氏菌和鼠伤寒杆菌的乙酰转移酶毒素通过抑制氨基酰 tRNA 的乙酰化抑制自身蛋白质翻译，从而诱导沙门氏菌在感染过程中持续性存在 (RYCROFT et al., 2018)。而已发表的 Mmm 全基因组序列中没有显示任何重要的毒力基因，如毒素或侵入素 (WESTBERG et al., 2004)。M0071 作为 ARSs 的家族成员，是否在 Mmm 蛋白合成、代谢途径及持续性感染中发挥作用，目前不得而知。

支原体在体内无法进行自我表达，往往要借助其他原核表达系统 (RAZIN, 1997)。而大肠杆菌由于自身具有良好的遗传背景，且容易培养、生长周期较短，是目前广泛使用的一种表达宿主，应用于蛋白表达纯化显示出简单、高效又经济的优点 (郝文君, 2020)。本研究将 M0071 基因克隆至原核表达载体 pET-32a(+), 并在 *E. coli* 中表达获得带有连续 6 个组氨酸残基 (His-tag) 的融合蛋白。经 SDS-PAGE 方法测定 rM0071 蛋白的分子量比预计分子量要大，这可能是由于 His-tag 中含有连续 6 个组氨酸而带有较强的正电荷，降低了融合蛋白的泳动速率，从而导致表观分子量的变大 (唐威华 等, 2000)。而且在研究 His-tag 融合蛋白时，SDS-PAGE 方法也只能用于其表达和纯化的初步检测，而不用作确定 His-tag 融合蛋白分子量的依据 (唐威华 等, 2000)。本研究利用该表达系统制备了大量可溶性表达的 rM0071 蛋白，为后续试验提供了重要材料。

第三章 抗 Mmm rM0071 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

本章以前期成功制备的免疫反应性良好、纯度较高的 rM0071 蛋白作为免疫抗原，制备出抗 Mmm 的特异性单克隆抗体。经间接 ELISA 方法筛选获得 1 株特异性单抗，即 MA b 3C4A1，经鉴定该单抗具有良好的特异性和反应性。

3.1 实验材料

3.1.1 菌株、细胞和实验动物

(1) 菌株：Mmm 分离株 (Ben-1、牧 1) 和模式株 PG1，以及山羊支原体山羊肺炎亚种、丝状支原体山羊亚种、牛鼻支原体、无乳支原体、牛支原体、leachii 支原体等菌种均由本实验保存；牛 A 型巴氏杆菌由哈尔滨兽医研究所牛羊病创新团队姜志刚副研究员赠送。

(2) 细胞：SP2/0 细胞、EBL 细胞由本实验室保存。

(3) 实验动物：SPF 级 BALB/c 小鼠，雌性，6 ~ 8 周龄，购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物实验批准文号：210201-01，所有动物实验操作均遵循我国《实验动物管理条例》中有关动物福利的要求。

3.1.2 主要试剂

- (1) Protein G 亲和层析柱，购自汇研生物公司；
- (2) HRP-山羊抗鼠 IgG，购自中杉金桥公司；
- (3) FITC-山羊抗鼠 IgG，购自 Sigma 公司；
- (4) 弗氏佐剂、HAT 和 HT 培养基、融合剂 PEG、TMB 显色液，均购自 Sigma 公司；
- (5) 1640 基础培养基、胎牛血清 (FBS)，购自 Gibco 公司；
- (6) 青霉素-链霉素双抗，购自 HyClone 公司；
- (7) 抗体亚类鉴定试剂盒，购自 Southern Biotech 公司；
- (8) 透析袋 (MW 8000-14000)，购自 Biosharp 公司；
- (9) 4%多聚甲醛固定液，购自碧云天公司；
- (10) 其他部分相同试剂参照“第二章 2.1.2”。

3.1.3 仪器设备

- (1) 显微镜 (CXK31) OLYMPUS
- (2) CO₂ 培养箱 (371) Thermo scientific
- (3) 细胞间生物安全柜 (logic) LABCONCO
- (4) 水平低温台式离心机 (Allegra X-15R) BECKMAN COULTER
- (5) 垂直低温台式离心机 (Allegra X-64R) BECKMAN COULTER
- (6) 其他部分相同仪器设备参照“第二章 2.1.3”。

3.1.4 试剂、溶液配制

(1) 1640 完全培养基: 将 50 mL 胎牛血清和 5 mL 青-链霉素双抗加入到 445 mL 1640 基础培养基中, 混合均匀, 于 4°C 存放。

(2) HAT 或 HT 培养基: 将 100 mL 胎牛血清和 5 mL 青-链霉素双抗加入到 395 mL 1640 基础培养基中, 再加入 1 小瓶 HAT (50×) 或 HT (50×) 粉末, 混合均匀, 于 4°C 存放。

(3) 5% 鱼明胶: 称量 5 g 鱼明胶加入到 100 mL PBS 或 PBST 缓冲液中, 完全溶解后使用。

(4) 碳酸盐缓冲液 (50 mM, pH 9.6): 称量 1.59 g 碳酸钠、2.93 g 碳酸氢钠, 溶解于 1 L 去离子水中, 调节 pH 至 9.6, 用 0.45 μm 滤器过滤。

(5) 硫酸终止液 (2 M): 此溶液配制在通风橱操作, 先量取 889 mL 去离子水于一 2 L 干净烧杯中, 然后使用移液枪缓慢加入总体积为 111 mL 的浓硫酸, 边加边用玻璃棒小心搅拌, 待室温放置冷却后小量分装到玻璃瓶中密封保存。

(6) 腹水纯化试剂

a) PB 缓冲液 (0.02 M, pH 7.0):

A 液 (0.2 M 磷酸二氢钠): 称量 31.202 g 二水合磷酸二氢钠, 溶解于 1 L 去离子水中;

B 液 (0.2 M 磷酸氢二钠): 称量 71.228 g 十二水磷酸氢二钠, 溶解于 1 L 去离子水中。

量取上述配制的 A 液 39.00 mL、B 液 61.00 mL, 然后加 900 mL 去离子水定容至 1 L 体积。

b) Binding buffer: 称量 1.7532 g 氯化钠, 溶解于 200 mL PB 缓冲液中。

c) Elution buffer (0.1 M 甘氨酸, pH 2.7): 称量 0.3754 g 甘氨酸, 溶解于 50 mL 去离子水中, 调节 pH 至 2.7。

d) Tris-HCl (1 M, pH 9.0): 称量 6.0568 g 三羟甲基氨基甲烷, 溶解于 50 mL 去离子水中, 调节 pH 至 9.0。

(7) HRP 标记抗体试剂

a) 醋酸盐缓冲液 (60 mM, pH 5.6):

A 液 (60 mM 醋酸钠): 称量 0.9844 g 醋酸钠, 溶解于 200 mL 去离子水中;

B 液 (60 mM 冰醋酸): 量取 0.688 mL 冰醋酸, 加入去离子水定容至 200 mL。

量取上述配制的 A 液 23.6 mL、B 液 16.4 mL, 将两者混匀并调节 pH 至 5.6。

b) 过碘酸钠 (NaIO₄) (60 mM): 称量 0.1283 g 高碘酸钠, 溶解于 10 mL 去离子水中。

c) 乙二醇 (160 mM): 量取 90 μL 乙二醇, 加入去离子水定容至 10 mL。

d) 碳酸盐缓冲液 (50 mM, pH 9.5): 称量 1.59 g 碳酸钠、2.93 g 碳酸氢钠, 溶解于 1 L 去离子水中, 调节 pH 至 9.5。

e) 硼氢化钠 (NaBH₄) (5 mg/mL): 称量 0.05 g 硼氢化钠, 溶解于 10 mL 去离子水中。

f) 饱和硫酸铵: 称量 80 g 硫酸铵加入到 100 mL 去离子水中, 置于 80°C 左右水浴中搅拌溶解, 然后趁热用滤纸过滤。待冷却后即有白色结晶析出, 使用前取一定体积的上清, 用浓氨水调节 pH 至 7.4。

(8) CBPP 完全培养基: 按照本实验室 CBPP 完全培养基配方配制。

(9) 其他部分相同溶液配制参照“第二章 2.1.4”。

3.2 实验方法

3.2.1 小鼠免疫

第一次免疫时，取 rM0071 蛋白抗原与等体积的弗氏完全佐剂混合，利用三通管将抗原和佐剂充分乳化，以乳化后液体滴入水中不扩散为标准，100 μg /只的剂量免疫，采用背部皮下多点注射。第二次开始使用弗氏不完全佐剂按照相同的乳化方法，每间隔两周免疫一次，剂量同首免。待小鼠完成 3 次免疫后，对其眼眶静脉丛采血并分离血清，利用间接 ELISA 方法测定血清效价，当血清抗体效价值达到 1 : 51200 以上时，抗体滴度最高的小鼠将可进行细胞融合，用 100 μg rM0071 纯抗原在融合前 3 ~ 5 天采用腹腔注射的方法对其加强免疫 1 次。

3.2.2 间接 ELISA 筛选方法的建立

- (1) 包被抗原：纯化的 rM0071 蛋白用碳酸盐缓冲液分别稀释至 10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，120 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 包被酶标板，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 h；
- (2) 封闭：5%鱼明胶封闭，200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h；
- (3) 一抗孵育：用 PBS 将免疫小鼠血清（阳性血清）和未免疫小鼠血清（阴性血清）作 1 : 100 稀释，然后分别倍比稀释 8 个梯度至 1 : 12800，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h；
- (4) 二抗孵育：用 PBS 将 HRP-山羊抗鼠 IgG 作 1 : 8000 稀释，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 50 min；
- (5) 显色：TMB 显色，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 10 min；
- (6) 终止、酶标仪读数：2 M 硫酸终止反应，测定 OD_{450nm} 值。

上述步骤（1 至 4）结束后均用 PBST 洗涤 3 次，5 min/次。根据试验结果，选取阳性血清 OD_{450nm} 值/阴性血清 OD_{450nm} 值 > 2.1，且阳性血清 OD_{450nm} 值接近 1.0 时所对应的条件作为最优抗原包被和血清稀释条件。

3.2.3 细胞融合

3.2.3.1 SP2/0 细胞的复苏培养

取一支冻存的 SP2/0 细胞，迅速放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中温育 2 min 左右，待细胞完全融化后，将其加入 5 mL 1640 基础培养基中，以 800 rpm 离心 5 min，弃掉上清；先吸取 2 mL 1640 完全培养基轻轻悬起细胞，吹散；然后先补加 15 mL 完全培养基于 75 cm^2 细胞培养瓶中，再加入细胞悬液，平放培养瓶并“8”字轻轻混匀，使细胞均匀平铺于细胞培养瓶底部，放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5%CO₂ 恒温细胞培养箱中培养。待细胞密度生长至 70% ~ 80% 且观察细胞大小均匀、状态良好时，取 1/3 或 1/2 体积的细胞进行传代培养，一般传代 3 ~ 5 次后用于细胞融合。

3.2.3.2 饲养层细胞的制备

在融合前 1 天完成饲养层细胞的制备，超净台中操作，具体操作步骤如下：

- (1) 取一只空白 BALB/c 小鼠，先对其进行眼球采血，然后脱颈致死，用 75% 酒精浸泡 8 ~ 10 min；
- (2) 取出小鼠放在解剖板上，用注射器针头固定好小鼠四肢；
- (3) 提起小鼠的腹部皮肤，并沿横方向剪一小口，然后向头尾两端拨开皮肤，露出完整的腹膜；

(4) 用干净的镊子将腹膜轻轻提起，小心不要戳破，然后使用 5 mL 注射器吸取 4 ~ 5 mL HAT 培养基注入到小鼠腹腔，小心按压使充分冲洗腹腔内巨噬细胞，然后注射器针头贴近腹膜提起，慢慢吸回腹腔内培养基，注入干净的加样槽中，反复进行两到三次此操作；

(5) 补加新的 HAT 培养基至 40 mL，用移液枪轻轻吹打混匀，100 μ L/孔平铺于 4 块 96 孔板中，放置培养箱培养。

3.2.3.3 脾细胞的制备

在进行细胞融合时现制备脾细胞，超净台中操作，具体操作步骤如下：

- (1) 取经加强免疫的小鼠，先对其进行眼球采血，然后脱颈致死，用 75% 酒精浸泡 8 ~ 10 min；
- (2) 取出小鼠放在解剖板上，用注射器针头固定好小鼠四肢；
- (3) 提起小鼠的腹部皮肤，沿横方向剪一小口，然后向头尾两端拨开皮肤，同样的方法剪开腹膜，打开腹腔，取出脾脏；
- (4) 脾脏取出后，先用少量 1640 基础培养基冲洗清理脾脏表面的结缔组织等，然后将脾脏放在研磨滤网中，用注射器针头扎几下，再轻轻研磨直至脾脏颜色变透明；
- (5) 最后，收集脾细胞悬液于 15 mL 离心管中。

3.2.3.4 细胞融合

- (1) 取一瓶生长至 80% 左右密度且细胞状态良好的 SP2/0 细胞，用 10 mL 1640 基础培养基吹落重悬，收集 SP2/0 细胞悬液于 15 mL 离心管中；
- (2) 将收集的 SP2/0 细胞悬液和脾细胞悬液先分别进行离心，800 rpm 离心 8 min，再用适量 1640 基础培养基重悬细胞，取少量细胞悬液进行细胞计数；
- (3) 以 1 : 10 的融合比例，取一定体积的 SP2/0 细胞悬液和脾细胞悬液混合，800 rpm 离心 8 min，弃掉细胞上清，再用适量 1640 基础培养基重悬细胞，洗涤离心一次；
- (4) 弃掉细胞上清，轻轻在 EP 管架上滑动离心管底部，使细胞沉淀松散；
- (5) 吸取 1 mL 预热至 37°C 的 PEG，在 1 min 内缓慢滴加入细胞混合体系中，边加边缓慢转动离心管；
- (6) 37°C 静置 90 s；
- (7) 在 10 min 内缓慢加入 20 mL 预热至 37°C 的 1640 基础培养基以终止 PEG 反应，具体操作方法为：在前两分钟内以 1 mL/min 的速度缓慢加入；第三分钟开始以 2 ~ 3 mL/min 的速度加入；第五分钟之后将剩余的 1640 基础培养基缓慢加入即可，边加边缓慢转动离心管；
- (8) 37°C 温育 5 ~ 8 min；
- (9) 将上述混合液进行 800 rpm 离心 8 min，弃掉细胞上清；
- (10) 先使细胞沉淀略微松散，然后先用 2 mL 预热至 37°C 的 HAT 培养基重悬细胞，轻轻吹散细胞团块，再吸取 HAT 培养基补加至 40 mL，倒入加样槽中，用移液枪轻轻吹打混匀，使用 8 孔排枪以 100 μ L/孔平铺到培养饲养层细胞的培养板中，放置培养箱培养；
- (11) 第二天开始观察孔内细胞有无污染，培养 4 ~ 6 天左右有肉眼可见的细胞团出现，并用 HT 培养基进行半换液，即每个细胞孔弃掉 100 μ L HAT 培养基，补加 100 ~ 150 μ L HT 培养基。

3.2.4 阳性杂交瘤细胞的筛选及亚克隆

在半换液后 2 ~ 3 天, 融合细胞孔内培养基颜色变黄, 按照 3.2.2 建立的间接 ELISA 方法对颜色变黄的细胞培养上清进行检测: 以细胞上清作为一抗, 100 μL /孔加入反应板。根据 ELISA 检测结果, 选择抗体效价高, 且孔内细胞团单一的细胞孔转 12 孔板扩大培养, 然后利用细胞计数法取 100 个细胞进行亚克隆, 按照相同的有限稀释法每次取不多于 100 个细胞进行 3 ~ 4 次亚克隆。直至抗体分泌稳定、阳性比例大于 95% 以上时, 收集细胞转大孔细胞培养板或细胞培养瓶进行扩大培养, 最后冻存保种于液氮中。

3.2.5 阳性杂交瘤细胞株的稳定性鉴定

将冻存的阳性杂交瘤细胞隔一定时间段进行复苏培养 (参考 3.2.3.1 描述的方法), 观察细胞的生长活性, 以检验细胞冻存效果; 同时, 将细胞连续传代培养 20 代以上, 分别收集每个代次的细胞培养上清, 间接 ELISA 测定抗体效价, 并通过比较不同代次抗体效价的变化以评估该阳性细胞株分泌抗体的稳定性。

3.2.6 单克隆抗体的特异性鉴定

选取可引起反刍动物呼吸道疾病的其他病原, 包括山羊支原体山羊肺炎亚种 (Mccp)、丝状支原体山羊亚种 (Mmc)、牛鼻支原体 (*M. bovirhinis*)、无乳支原体 (*M. agalactiae*)、牛支原体 (*M. bovis*)、leachii 支原体 (*M. leachii*)、牛 A 型巴氏杆菌、Mmm 分离株 (Ben-1 和牧 1) 及其模式株 PG1 的全菌体蛋白, 与纯化的 rM0071 蛋白同时进行 SDS-PAGE 电泳, 然后利用半干转膜仪以 18 V、1 h 将其转印至 NC 膜上, 用 5% 鱼明胶封闭, 然后加入 1 : 10 稀释的杂交瘤细胞培养上清与上述抗原反应, HRP-山羊抗鼠 IgG 作 1 : 8000 稀释, 经 ECL 显色分析该单抗的特异性, 具体参照 2.2.3 中描述的 Western blot 方法。Mmm 分离株 Ben-1 和牧 1 及其标准株 PG1 均在高级别生物安全实验室培养和灭活, 制备全菌体蛋白。

3.2.7 单克隆抗体的亚类鉴定

按照抗体亚类鉴定试剂盒说明书, 操作方法如下 (部分具体步骤参照 3.2.2 中描述的 ELISA 方法):

- (1) 包被抗原: rM0071 蛋白稀释至 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 16 h;
- (2) 封闭: 5% 鱼明胶封闭, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h;
- (3) 一抗孵育: 加入杂交瘤细胞培养上清, 100 μL /孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;
- (4) 二抗孵育: 分别加入 1 : 500 稀释的 HRP-抗鼠 Ig、IgA、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、 κ 、 λ 亚类抗体, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 50 min;
- (5) 显色: TMB 显色, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 10 min;
- (6) 终止、读数: 2 M 硫酸终止反应, 测定 OD_{450nm}, 最大 OD_{450nm} 值对应的即为单抗所属亚类。

3.2.8 腹水的制备与单克隆抗体的纯化、HRP 标记

3.2.8.1 腹水的制备

本试验选择弗氏不完全佐剂致敏小鼠，0.5 mL/只，采用腹腔注射。7 d 后，采用细胞计数法，取 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个杂交瘤细胞注射到致敏小鼠腹腔，同时注射 SP2/0 细胞作为阴性对照。从第 5 天开始每天观察小鼠腹部变化，待小鼠腹部明显膨大后使用 5 mL 注射器对其进行腹水的采集，之后每天观察多次采集直至小鼠死亡。采集的腹水于 4°C 8000 rpm 离心 30 min，收集中间的腹水层，于 -80°C 保存备用。

3.2.8.2 腹水的纯化

采用 Protein G 亲和层析法纯化腹水，操作方法如下：

- (1) 样品制备：以 1 : 3 比例混合腹水与 Binding buffer，用 0.45 μm 滤器过滤；
- (2) 清洗柱子：用 10 mL 去离子水过柱清洗，以 1 mL/min 的流速；
- (3) 平衡柱子：用 20 mL Binding buffer 过柱平衡，以 1 mL/min 的流速；
- (4) 挂柱结合：将样品以 0.2 mL/min 的流速过柱结合，反复过柱 2 ~ 3 次；
- (5) 洗杂：用 50 mL Binding buffer 过柱，洗掉未与柱子结合的杂蛋白，以 1 mL/min 的流速；
- (6) 洗脱：预先准备 12 个 1.5 mL 离心管，分别加入 120 μL Tris-HCl，用 5 mL Elution buffer 过柱洗脱，使每管收集洗脱液至 500 μL 总体积。测定每管蛋白 (IgG) 浓度，取洗脱峰处收集的蛋白，小量分装，于 -80°C 保存备用；
- (7) 柱子保存：先用 10 mL 去离子水过柱清洗，再用 20% 乙醇过柱清洗数次，置于 4°C 存放；
- (8) SDS-PAGE 鉴定：将纯化的抗体进行 SDS-PAGE 分析，以检验纯化抗体的效果。

3.2.8.3 单克隆抗体的抗体效价测定

采用间接 ELISA 方法测定单抗的杂交瘤细胞培养上清、纯化前及纯化后腹水的抗体效价。即试验方法为：将细胞上清以 1 : 10 进行 2 倍比稀释，腹水和纯化后腹水以 1 : 1000 进行 2 倍比稀释。将 SP2/0 腹水也以 1 : 10 和 1 : 1000 进行 2 倍比稀释作为阴性对照。

3.2.8.4 单克隆抗体的 HRP 标记

采用经典的过碘酸钠法，操作方法如下：

- (1) 称量 HRP 5 mg，加入 1 ~ 2 mL 60 mM 醋酸盐缓冲液 (pH 5.6) 中溶解，溶液呈浅棕红色；
- (2) 加入 0.5 mL 60 mM 的 NaIO_4 溶液氧化 HRP，于 4°C 静置反应 30 min，溶液呈草绿色；
- (3) 加入 0.5 mL 160 mM 的乙二醇，以终止氧化反应，室温避光作用 30 min，溶液逐渐恢复原来的棕红色；
- (4) 将 5 mg 纯化后的单抗加入上述溶液中，以碳酸盐缓冲液 (pH 9.5) 为透析液，于 4°C 透析 12 h 以上；
- (5) 吸取透析袋中的溶液于干净 EP 管中，加入 0.2 mL 新鲜配制的 NaBH_4 (5 mg/mL) 溶液，混匀，然后 4°C 静置作用 2 h；
- (6) 加入等体积的饱和硫酸铵溶液 (pH 7.4) 于上述制备的酶标抗体溶液中，4°C 静置 1 h；
- (7) 4°C 12000 rpm 离心 15 min，弃掉上清。沉淀用 3 ~ 5 mL PBS 重悬溶解，并以 PBS (pH 7.4) 为透析液于 4°C 透析 12 h 以上；

(8) 收集透析后的溶液于干净 EP 管中, 4°C 12000 rpm 离心 30 min, 收集上清, 即为纯化得到的酶标抗体。小量分装后于 -80°C 保存。

3.2.8.5 HRP 标记单抗的质量鉴定

采用直接 ELISA 方法对所标记单抗进行质量鉴定, 即: 将 HRP 标记单抗先进行 1:100 稀释, 然后 2 倍比稀释 8 个梯度至 1:12800, 100 μ L/孔加入包被抗原的反应板, 37°C 孵育 1 h, 同时设置未包被抗原的空酶标板对照。若以 1:400 稀释酶标单抗时, OD_{450nm} 读数仍在 0.8 以上, 即认为单抗标记合格 (王丛丛, 2021)。

3.2.9 单克隆抗体的 IFA 检测

取 10⁸ CCU 的 Mmm 分离株牧 1 培养物, 离心后用高压灭菌的 PBS 洗涤 3 次, 然后用 12 mL DMEM 细胞完全培养基重悬菌体沉淀、吹打混匀。按照 500 μ L/孔将重悬的牧 1 菌体纯培养物接种于铺有 EBL 细胞的 24 孔细胞培养板中, 同时设置未感染细胞为空白对照, 于 37°C 细菌培养箱培养 6 h, 然后用移液枪小心吸弃培养液, 用 PBS 洗涤未黏附的菌体。使用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 30 min, 然后加入 5% 鱼明胶, 室温封闭 1 h; 将单抗、免疫小鼠血清、未免疫小鼠血清均作 1:100 稀释分别加入细胞孔中, 室温孵育 1 h; FITC-山羊抗鼠 IgG 作 1:800 稀释, 室温避光孵育 1 h。上述每一步骤结束均需 PBST 洗涤 3 次, 10 min/次。试验结束后, 将细胞置于倒置荧光显微镜下观察、分析并采集图像。牧 1 感染 EBL 细胞及其 IFA 检测均在高级别生物安全实验室操作。

3.3 结果

3.3.1 间接 ELISA 方法的建立及阳性杂交瘤细胞株筛选、稳定性鉴定

根据方阵滴定法结果, 确定 rM0071 蛋白以 2.5 μ g/mL 包被, 一抗作 1:3200 稀释, HRP-山羊抗鼠 IgG 作 1:8000 稀释, 其他条件均按照 ELISA 方法的常规反应进行。本试验筛选获得 1 株能稳定分泌抗 Mmm 抗体的杂交瘤细胞株, 命名为 3C4A1。经大量培养后, 按常规冻存方法冻存细胞株。分别将冻存半个月、1 个月、3 个月、6 个月等时间段的 3C4A1 细胞株进行复苏培养, 细胞生长状态较好, 连续传 20 代的细胞上清效价保持稳定, 说明细胞株 3C4A1 具有良好的稳定性。

3.3.2 MAbs 3C4A1 的特异性测定

Western blot 试验结果如图 3-1 所示, MAbs 3C4A1 能与 rM0071 蛋白 (图 3-1, 泳道 1) 和 Mmm 分离株 Ben-1、牧 1 及其标准株 PG1 发生特异性反应 (图 3-1, 泳道 2-4), 而不与 Mccp、Mmc、M. bovirhinis、M. agalactiae、M. bovis、M. leachii 和牛 A 型巴氏杆菌等发生反应 (图 3-1, 泳道 5-11)。说明制备的单抗具有很高的种属特异性, 可用于区分 Mmm 和其他病原。

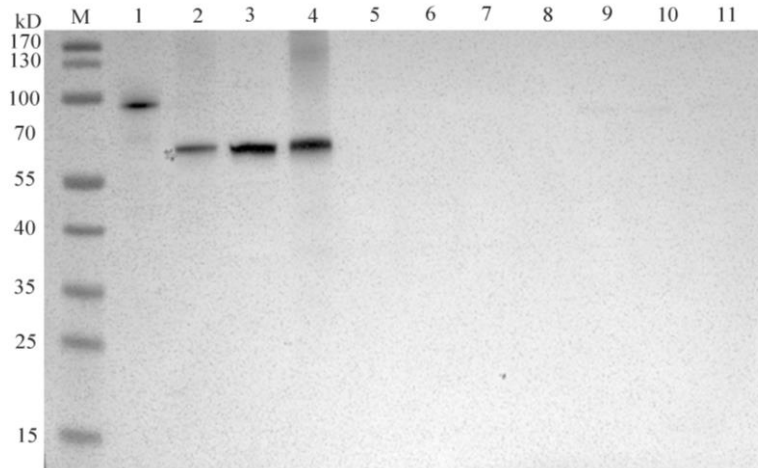


图 3-1 MAb 3C4A1 特异性鉴定

Fig. 3-1 Specificity identification of MAb 3C4A1

M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. rM0071 蛋白; 2. Mmm 分离株 Ben-1; 3. Mmm 分离株牧 1; 4. Mmm 模式株 PG1; 5. Mccp; 6. Mmc; 7. *M. bovirhinis*; 8. *M. agalactiae*; 9. *M. bovis*; 10. *M. Leachii*; 11. 牛 A 型巴氏杆菌
 M. Protein molecular weight marker; 1. rM0071 protein; 2. Mmm isolate Ben-1; 3. Mmm isolate Mu 1; 4. Mmm type strain PG1; 5. *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, Mccp; 6. *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, Mmc; 7. *Mycoplasma bovirhinis*; 8. *Mycoplasma agalactiae*; 9. *Mycoplasma bovis*; 10. *Mycoplasma leachii*; 11. Bovine pasteurella type A

3.3.3 MAb 3C4A1 的亚类测定结果

亚类鉴定结果如表 3-2 所示，MAb 3C4A1 属于 IgG1 亚类，轻链为 κ 链（表 3-2）。

表 3-2 MAb 3C4A1 抗体亚类鉴定

Table 3-2 Antibody subclass identification of MAb 3C4A1

	抗体亚类								
	Ig	IgA	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	Kappa	Lambda
OD _{450nm} 值	2.292	0.087	0.127	3.1	0.474	0.25	0.254	2.935	0.119

3.3.4 腹水纯化的纯度鉴定

SDS-PAGE 电泳分离鉴定结果如图 3-2 所示，纯化后的 MAb 3C4A1 可见一条约 55 kD 的重链和一条约 25 kD 的轻链，与 IgG 大小一致，无其他杂蛋白条带存在，纯化效果良好。

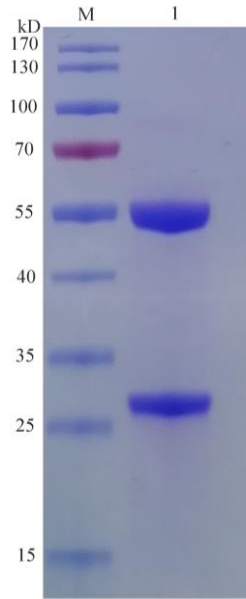


图 3-2 MAb 3C4A1 纯化鉴定

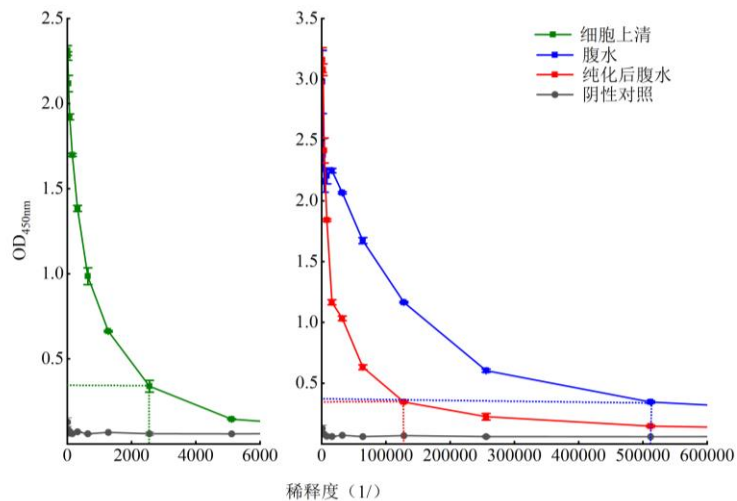
Fig. 3-2 Purification of MAb 3C4A1

M. 蛋白质相对分子质量标准；1. 纯化的 MAb 3C4A1

M. Protein molecular weight marker; 1. Purified MAb 3C4A1

3.3.5 抗体效价测定结果

检测 MAb 3C4A1 细胞培养上清、小鼠腹水纯化前和纯化后的抗体效价，结果如图 3-3 所示，杂交瘤细胞培养上清的抗体效价为 $1 : 2.56 \times 10^3$ (图 3-3 (a))，腹水的抗体效价为 $1 : 5.12 \times 10^5$ ，纯化后腹水的抗体效价为 $1 : 1.28 \times 10^5$ (图 3-3 (b))。



(a)

(b)

(a) 细胞上清；(b) 腹水和纯化后腹水

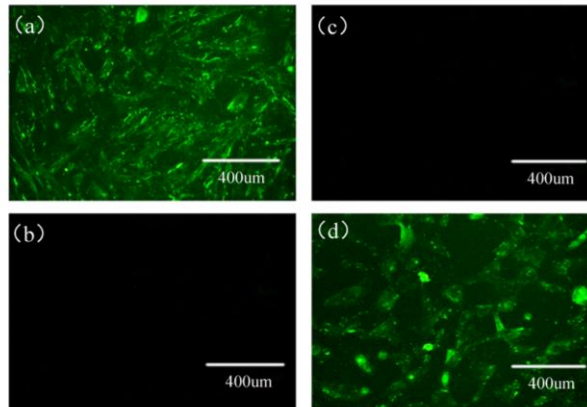
(a) Cell supernatant; (b) Ascites and purified ascites

图 3-3 MAb 3C4A1 抗体效价测定结果

Fig. 3-3 Antibody potency of MAb 3C4A1

3.3.6 MAb 3C4A1 的 IFA 检测结果

将接种牧 1 的 EBL 细胞培养后, 以 MAb 3C4A1 作为一抗, 进行绿色荧光鉴定, 结果如图 3-4 所示, 接种牧 1 的细胞孔和免疫小鼠血清作一抗的阳性对照孔有明显的绿色荧光, 而未免疫小鼠血清作一抗的阴性对照孔和未感染的空白对照孔均未出现绿色荧光, 说明 MAb 3C4A1 能够与感染 EBL 细胞的 Mmm 发生特异性免疫反应。



(a) 阳性对照; (b) 阴性对照; (c) 空白对照; (d) 牧 1
(a) Positive control; (b) Negative control; (c) Blank control; (d) Mu 1

图 3-4 MAb 3C4A1 的 IFA 检测结果

Fig. 3-4 IFA identification of MAb 3C4A1

3.3.7 HRP 标记抗体的质量鉴定

利用过碘酸钠法标记 MAb 3C4A1 获得 HRP-3C4A1 酶标抗体。抗体标记效率经直接 ELISA 测定, 结果如图 3-5 显示, 在空白孔对照成立的条件下, 当 HRP-3C4A1 进行 1:1600 稀释, OD_{450nm} 值仍大于 1.0, 表明 HRP-3C4A1 标记合格, 可用于下一步试验。

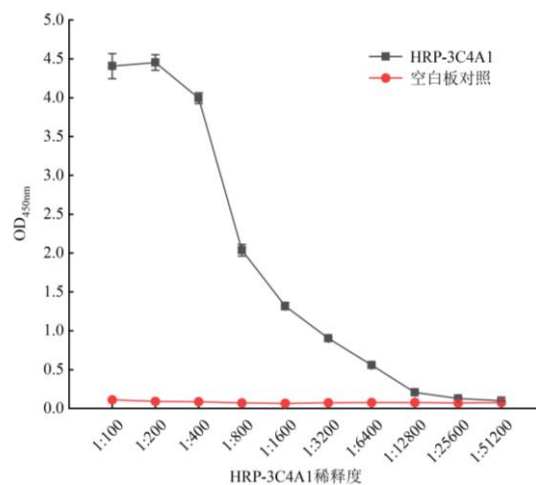


图 3-5 HRP-3CA1 抗体标记效率检测

Fig. 3-5 Antibody labeling efficiency assay of HRP-3C4A1

3.4 讨论

2011 年我国被 OIE 认证为无 CBPP 国家 (XIN et al., 2012), 迄今为止一直保持着无疫状态。基于此现状, 我国关于 Mmm 检测技术的研究相对缓慢和滞后, 目前尚无可用于 CBPP 诊断的特异性试剂。而特异性强的单克隆抗体已被证明可用于支原体物种鉴定, 是建立快速、准确的病原或抗体检测方法必不可少的工具 (RODRIGUEZ et al., 1997; HWANG et al., 1989)。它具有高度的特异性和敏感性, 可避免诊断过程中产生交叉反应 (NGUYEN et al., 2019)。针对 Mmm 单克隆抗体的研究已有很多报道, Brooks 等 (2009) 和 Rodriguez 等 (1996) 分别成功制备了抗 Mmm 的特异性单克隆抗体 MA b 6E3 和 MA b 3H12, 均显示良好的特异性, 与其他病原不存在交叉反应, 而且基于此两株单抗建立的双抗夹心 ELISA 检测方法, 具有重要的参考意义。Le Goff 等 (1998) 也成功制备抗 Mmm 的单克隆抗体 MA b 117/5, 基于该单抗的 cELISA 检测方法是目前 OIE 推荐使用的 CBPP 血清学检测方法, 它在临床检测使用中具有较高的特异性。综上所述, 抗 Mmm 单克隆抗体的制备是建立特异、敏感的 CBPP 血清学诊断方法的利器。

本研究以具有良好免疫反应性的 rM0071 蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 成功制备 1 株能够特异性识别 Mmm 的单克隆抗体 MA b 3C4A1, 它与其他病原如 Mccp、Mmc、M. bovirhinis、M. agalactiae、M. bovis、M. leachii 和牛 A 型巴氏杆菌等不发生免疫反应。有研究报道 Mmm 能够粘附于 EBL 细胞上 (ZHOU et al., 2016; AYE et al., 2015), 本研究中的 IFA 试验进一步证实了 MA b 3C4A1 能够与粘附 EBL 细胞的 Mmm 发生特异性免疫反应。上述结果表明 MA b 3C4A1 是针对 Mmm 的特异性抗体, 并具有良好的免疫反应性, 其有望替代官方推荐的 IFA 免疫学检测方法中使用的免多抗, 也为研制 CBPP 血清学诊断方法提供了基础数据。

酶标抗体是免疫学检测中的关键试剂, 可以简化 ELISA 反应程序, 避免了使用商品化酶标抗体产生的非特异, 从而也缩短了检测的时间, 而且抗体标记的质量对 ELISA 反应的敏感性和特异性也具有重要影响。经典的过碘酸钠法标记抗体操作简单, 而且标记过程中一般不会破坏抗体和 HRP 酶的活性, 效率很高, 是抗体标记方法中较常用的一种。从实验结果可以看出, 本文制备的酶标抗体 HRP-3C4A1 标记合格, 但其标记效率与商品化抗体相比还有待提高, 仍需要进一步优化条件。

第四章 CBPP 竞争 ELISA 抗体检测方法的初步建立

为进一步探究单克隆抗体 MAb 3C4A1 在 CBPP 诊断方法中的应用前景，本章以制备的 HRP-3C4A1 作为检测抗体，并对抗原包被浓度、检测抗体稀释度、血清稀释度等条件进行优化，建立了 cELISA 检测方法。通过检测大量临床血清样品，与 CBPP 抗体检测试剂盒（IDEXX）检测结果进行比较，进一步评估该方法的临床应用价值。

4.1 实验材料

4.1.1 血清

- (1) CBPP 阴性、阳性血清均来源于本实验室。
- (2) 本实验所用其他 CBPP 临床阴性、阳性血清也均由本实验室保存。
- (3) 牛支原体、无乳支原体、牛鼻支原体、leachii 支原体等标准阳性血清由本实验室保存。
- (4) 牛传染性鼻气管炎、牛病毒性腹泻、牛结核、牛副结核等标准阳性血清由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所保存。

4.1.2 主要试剂

- (1) CBPP 抗体检测商品化试剂盒，购自 IDEXX 公司；
- (2) 马血清，购自 Gibco 公司；
- (3) HRP-山羊抗鼠 IgG，购自 Sigma 公司；
- (4) 其他部分相同试剂参照“第二章 2.1.2 和第三章 3.1.2”。

4.1.3 仪器设备

- (1) 酶标仪（EL×808） BIO-RAD
- (2) 96 孔板混匀仪（SCI-M） SCILOGEX
- (3) 其他部分相同仪器设备参照“第二章 2.1.3 和第三章 3.1.3”。

4.1.4 试剂、溶液配制

- (1) 1% 马血清：量取 1 mL 马血清，加入到 99 mL PBS 或 PBST 中。
- (2) 1% 鱼明胶：称量 1 g 鱼明胶，加入到 100 mL PBS 或 PBST 缓冲液中，完全溶解后使用。
- (3) 其他部分相同溶液配制参照“第二章 2.1.4 和第三章 3.1.4”。

4.2 实验方法

4.2.1 竞争 ELISA 检测方法的基本反应程序

- (1) 包被抗原：用碳酸盐缓冲液将纯化的 rM0071 蛋白稀释至适宜浓度，120 μ L/孔包被酶标板，

4°C 孵育过夜，弃液，用 PBST 洗涤 3 次；

(2) 封闭：加入 5% 鱼明胶封闭，200 μL /孔，37°C 孵育 2 h，弃液，用 PBST 洗涤 3 次；

(3) 竞争反应：先在预反应板上对血清进行一定倍数稀释，然后加入等体积稀释后的酶标抗体 HRP-3C4A1，混匀，100 μL /孔转移到反应板中，37°C 孵育 1 h，弃液，用 PBST 洗涤 3 次；

(4) 显色：TMB 显色，100 μL /孔，37°C 避光反应 10 min；

(5) 终止、酶标仪读数：100 μL /孔加入 2 M 硫酸终止液，并测定波长 450nm 处的 OD 值。

4.2.2 抗原最适包被浓度和血清最佳稀释度的确定

按照棋盘滴定法，将包被抗原 rM0071 蛋白分别稀释至终浓度为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包被 ELISA 板，将 CBPP 阴性、阳性血清以 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80 的稀释度与稀释后的 HRP-3C4A1 等体积混合，取 100 μL 加入酶标板，37°C 孵育 1 h，按照常规 ELISA 程序操作。计算 N/P 值，以最高 N/P 值对应条件作为最优抗原包被和血清稀释条件。

4.2.3 酶标抗体最佳稀释度的确定

以 4.2.2 中确定的抗原包被浓度和血清稀释度作为不变量，改变 HRP-3C4A1 的稀释度，即进行 1:100、1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000 稀释，共设置三组 CBPP 阴性、阳性血清实验组，计算 N/P 值，以最高 N/P 值对应组作为 HRP-3C4A1 的最佳稀释度。

4.2.4 反应条件的进一步优化

在上述确定的最优条件下，对竞争反应中其他条件进行再优化，所有优化实验均设置两组 CBPP 阴性、阳性血清实验组，最终计算 N/P 值，以最高 N/P 值对应反应条件为最优。

(1) 最适包被条件的确定

以 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液作为包被液，对包被条件进行优化：分别在 37°C 条件下包被抗原 1 h、1.5 h 和 2 h，以及 4°C 包被 12 h 和 16 h。

(2) 最佳封闭液的选择及封闭条件的确定

选择 1% 马血清、1% 鱼明胶、5% 鱼明胶三种封闭液，分别在 37°C 条件下封闭 1 h、1.5 h 和 2 h。

(3) 最佳竞争孵育时间的确定

在 37°C 条件下共孵育血清与酶标抗体，孵育时间分别为 0.5 h、1 h、1.5 h 和 2 h。

(4) 最佳显色条件的确定

分别于室温避光反应 10 min、15 min，37°C 避光反应 5 min、10 min、15 min。

4.2.5 临界值的判定

取经 IDEXX 试剂盒检测为 CBPP 阳性的牛血清 108 份和 CBPP 阴性牛血清 470 份，按照最佳稀释度稀释后与检测抗体 HRP-3C4A1 混合进行 cELISA 试验，同时设置不加血清的酶标抗体

对照孔, 测定 OD_{450nm} 值, 根据公式计算其抑制率 (PI), $PI = (1 - \text{待检血清 } OD_{450nm} \text{ 值} / \text{酶标抗体对照 } OD_{450nm} \text{ 值}) \times 100\%$ 。应用 GraphPad Prism 软件对结果进行分析, 绘制 ROC 曲线, 确定临界值。

4.2.6 特异性分析

利用已建立的 cELISA 方法分别检测 500 份 CBPP 阴性血清和其他牛源性呼吸道疾病的标准阳性血清, 包括牛传染性鼻气管炎 (IBR)、牛病毒性腹泻 (BVD)、牛结核 (bTB)、牛副结核 (Bovine paratuberculosis)、牛支原体 (*M. bovis*)、无乳支原体 (*M. agalactiae*)、牛鼻支原体 (*M. bovirhinis*)、leachii 支原体 (*M. leachii*), 同时选择 1 份 CBPP 标准阴性血清和 1 份 CBPP 标准阳性血清作为对照, 计算相应血清的 PI 值, 以评估本方法的特异性。

4.2.7 敏感性分析

(1) 选取 70 份 CBPP 已知阳性血清, 利用已建立的 cELISA 方法进行检测, 根据检测结果评估本方法的敏感性。

(2) 选取 3 份 CBPP 阳性血清, 血清稀释不同倍数, 利用已建立的 cELISA 方法测定该方法能检出血清阳性的最高稀释倍数, 以评估本方法的灵敏度。

4.2.8 重复性试验

分别选择同一批次包被的 3 块酶标板、以及 3 个不同批次包被的酶标板, 利用已建立的 cELISA 方法分别检测 6 份 CBPP 血清样本 (3 份阳性和 3 份阴性), 进行 3 次重复实验, 计算 PI 值及对应变异系数 (CV)。

4.2.9 符合率试验

用所建立的 cELISA 方法检测近三年来自新疆、云南、内蒙古和广西等四个省份的 1408 份临床牛血清样本, 同时使用 CBPP 抗体检测试剂盒 (IDEXX) 也对此 1408 份样品进行检测, 统计检测结果, 计算两种检测方法的符合率。

4.3 结果

4.3.1 抗原最适包被浓度和血清最佳稀释度的确定

设置七组不同的 rM0071 蛋白抗原包被浓度和五组不同的血清稀释度, 按照棋盘滴定法进行 cELISA 试验, 统计 OD_{450nm} 值结果见表 4-1, 计算 N/P 值。数据分析结果如图 4-1 所示, 根据 N/P 值最大即确定 rM0071 蛋白的最适包被浓度为 $2 \mu\text{g/mL}$, 血清的最佳稀释度为 1:10。

表 4-1 七组抗原包被浓度和五组血清稀释度以棋盘滴定检测结果

Table 4-1 Checkerboard titration results of seven of antigen encapsulation concentration and of serum dilution

		抗原包被浓度 ($\mu\text{g/mL}$)						
		0.25	0.5	1	2	4	8	16
阳性 血清 稀释 度	1 : 5	0.165	0.143	0.15	0.134	0.141	0.137	0.142
	1 : 10	0.185	0.164	0.175	0.144	0.152	0.16	0.163
	1 : 20	0.25	0.211	0.241	0.2	0.189	0.204	0.223
	1 : 40	0.348	0.283	0.273	0.268	0.23	0.273	0.298
	1 : 80	0.431	0.379	0.351	0.357	0.309	0.365	0.356
阴性 血清 稀释 度	1 : 5	1.167	1.117	1.124	1.162	1.182	1.172	1.09
	1 : 10	1.21	1.155	1.121	1.258	1.251	1.269	1.141
	1 : 20	1.226	1.201	1.256	1.24	1.271	1.139	1.11
	1 : 40	1.243	1.308	1.294	1.302	1.249	1.267	1.112
	1 : 80	1.261	1.226	1.206	1.258	1.223	1.214	1.125

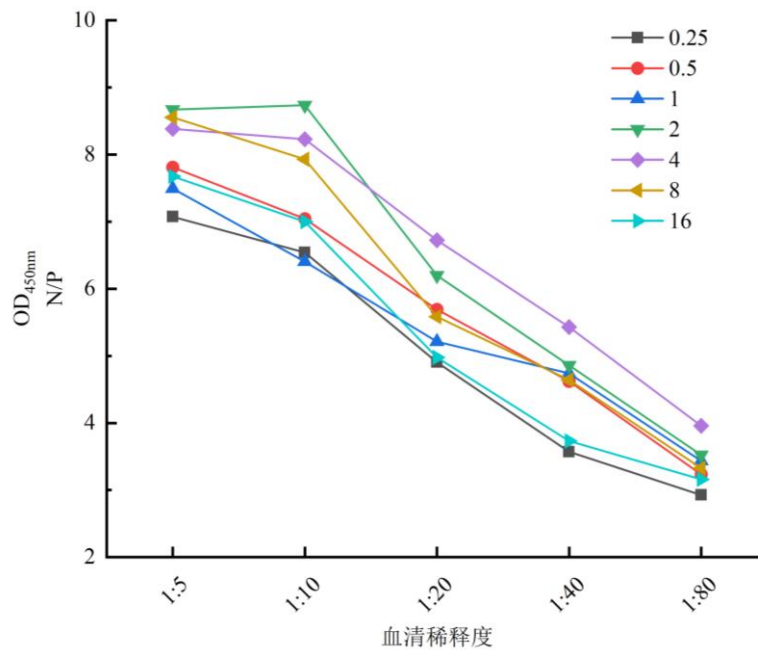


图 4-1 最适抗原包被浓度和血清最佳稀释度的确定

Fig. 4-1 Determination of the optimal coating concentration of antigen and the optimal dilution of serum

4.3.2 HRP-3C4A1 最佳稀释度的确定

基于 4.3.1 中已确定的抗原包被浓度和血清稀释度进行 cELISA 试验, 将 HRP-3C4A1 稀释 6 个梯度, 分别检测三组阴性、阳性血清样本, 统计 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值结果见表 4-2, 计算 N/P 值。数据分析结果如图 4-2 所示, 根据 N/P 值最大即确定 HRP-3C4A1 最佳稀释度为 1 : 2000。

表 4-2 HRP-3C4A1 不同稀释度检测结果

Table 4-2 The results at different dilutions of HRP-3C4A1

酶标抗体稀释度	三组标准血清样本						
	P1	N1	P2	N2	P3	N3	
HRP - 3C4A1	1 : 100	0.587	2.452	0.304	2.492	0.473	2.517
	1 : 500	0.356	2.343	0.205	2.05	0.304	2.389
	1 : 1000	0.268	1.217	0.138	1.393	0.237	1.274
	1 : 2000	0.134	1.156	0.089	1.206	0.126	1.117
	1 : 4000	0.127	0.824	0.09	1.01	0.141	0.917
	1 : 8000	0.093	0.507	0.084	0.493	0.112	0.556

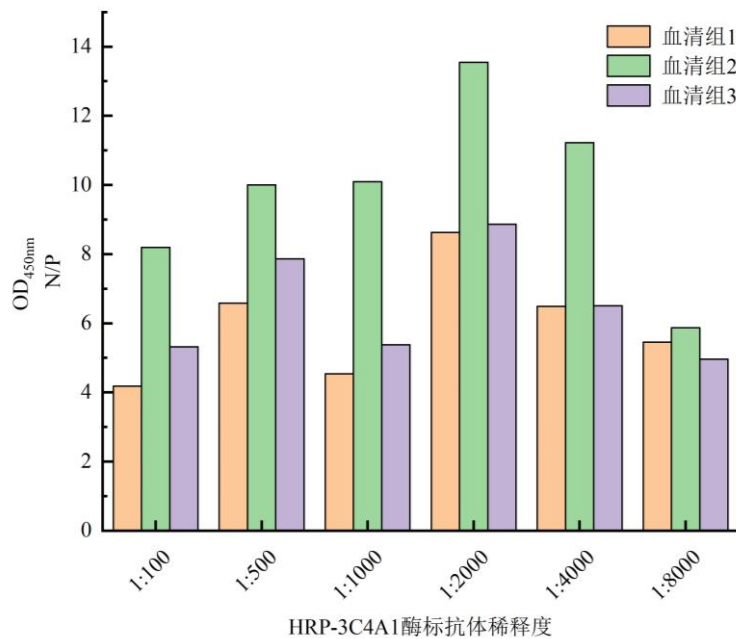


图 4-2 HRP 标记单抗最佳稀释度的确定

Fig. 4-2 Determination of the optimal dilution of HRP-labeled monoclonal antibody

4.3.3 最佳反应条件的确定

按照 4.2.4 中的描述依次对本方法进行条件优化, 根据 N/P 值最大即确定最佳反应条件为: rM0071 蛋白抗原于 4°C 包被 16 h (表 4-3); 封闭液选择 5% 鱼明胶, 于 37°C 封闭 2 h (表 4-4); 待检血清与检测抗体等体积混合于 37°C 孵育 1 h (表 4-5); TMB 底物显色于 37°C 避光反应 10 min (表 4-6)。

表 4-3 最适抗原包被条件的确定

Table 4-3 Determination of optimal antigen coating conditions

抗原包被条件		两组标准血清样本 (N/P 值)					
		P1	N1	N/P	P2	N2	N/P
37°C	1 h	0.089	0.535	6.011	0.095	0.577	6.074
	1.5 h	0.114	0.715	6.272	0.108	0.803	7.435
	2 h	0.137	1.162	8.482	0.143	1.267	8.86
4°C	12 h	0.129	1.048	8.124	0.131	1.266	9.664
	16 h	0.125	1.245	9.96	0.138	1.409	10.21

表 4-4 最佳封闭液的选择及封闭条件的确定

Table 4-4 Selection of the best sealing solution and determination of the sealing conditions

封闭条件		两组标准血清样本 (N/P 值)					
		P1	N1	N/P	P2	N2	N/P
1% 鱼明胶	1 h	0.285	1.279	4.488	0.278	1.32	4.748
	1.5 h	0.213	1.244	5.84	0.234	1.296	5.538
	2 h	0.228	1.234	5.412	0.21	1.252	5.962
5% 鱼明胶	1 h	0.222	1.247	5.617	0.271	1.269	4.683
	1.5 h	0.174	1.263	7.259	0.183	1.23	6.721
	2 h	0.141	1.215	8.617	0.136	1.195	8.787
1% 马血清	1 h	0.511	1.569	3.070	0.606	1.68	2.772
	1.5 h	0.487	1.538	3.158	0.556	1.677	3.016
	2 h	0.422	1.451	3.438	0.464	1.584	3.414

表 4-5 最佳竞争孵育时间的确定

Table 4-5 Determination of the optimal competitive incubation time

竞争孵育时间		两组标准血清样本 (N/P 值)					
		P1	N1	N/P	P2	N2	N/P
37°C	0.5 h	0.091	0.732	8.044	0.118	0.898	7.61
	1 h	0.136	1.152	8.471	0.151	1.26	8.344
	1.5 h	0.167	1.149	6.88	0.219	1.343	6.132
	2 h	0.277	1.274	4.599	0.325	1.398	4.302

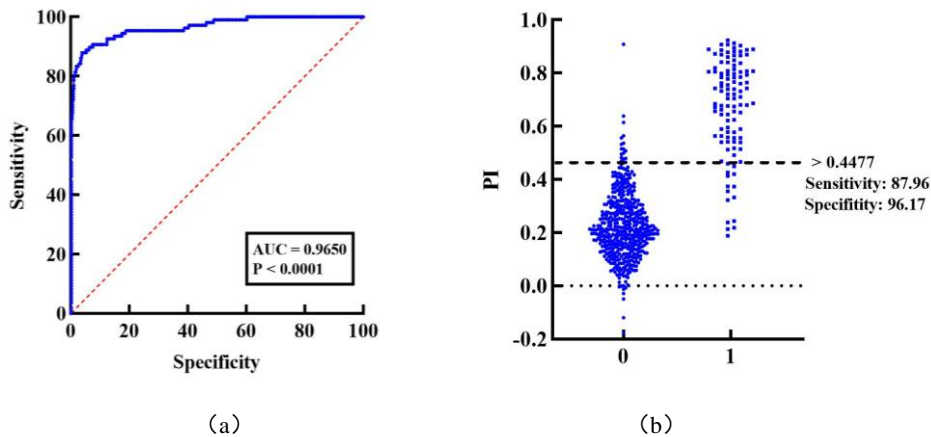
表 4-6 最佳 TMB 显色条件的确定

Table 4-6 Determination of optimal TMB color development conditions

TMB 显色条件	两组标准血清样本 (N/P 值)						
	P1	N1	N/P	P2	N2	N/P	
室温避光	10 min	0.129	1.051	8.147	0.115	1.148	9.983
	15 min	0.237	1.171	4.941	0.192	1.193	6.214
	5 min	0.11	0.862	7.836	0.099	0.94	9.495
37°C避光	10 min	0.145	1.224	8.441	0.128	1.304	10.188
	15 min	0.311	1.396	4.489	0.267	1.417	5.307

4.3.4 Cut-off 值的确定

选取经 IDEXX 商品化试剂盒检测的 578 份 CBPP 血清样本(包括 108 份阳性血清样本和 470 份阴性血清样本)进行 cELISA 方法检测,并计算血清 PI 值。然后利用 GraphPad Prism 软件作 ROC 曲线分析,根据 95%的置信区间(CI)下的 DS_n、DS_p、性能指标(P)确定该方法的最优 cut-off 值。结果如图 4-3 (a) 和 (b) 所示,确定该方法的最优 cut-off 值为 44.77%,此时对应的曲线下面积(AUC)为 0.9650 (95% CI: 0.9449 ~ 0.9852),敏感性为 87.96% (95% CI: 80.49% ~ 92.83%),特异性为 96.17% (95% CI: 94.03% ~ 97.56%)。因此,确定本研究建立的 cELISA 方法的判定标准为:待检血清的 PI ≥ 44.77% 时,判定为阳性,PI < 44.77% 时,判定为阴性。



(a) ROC curve; (b) Dot plot of PI distribution of 578 CBPP serum samples

图 4-3 用 GraphPad Prism 软件作 ROC 曲线确定 cELISA 方法的临界值

Fig. 4-3 Determination of the critical value for cELISA method by GraphPad Prism software

4.3.5 特异性及交叉反应性试验分析结果

(1) 利用该方法检测 500 份 CBPP 已知阴性血清,检测结果显示 488 份血清 PI < 44.77% 为阴性,显示该方法的特异性为 97.6% (488/500)。

(2) 检测 CBPP、IBR、BVD、bTB、牛副结核(也叫 Johne's disease)、M. bovis、M. agalactiae、

M. bovirhinis 和 M. leachii 的标准阳性血清，结果如图 4-4 所示，除 CBPP 标准阳性血清的 PI 值高于 44.77%，其他牛源性呼吸道疾病的标准阳性血清 PI 值均低于 44.77%（10.43% ~ 26.0%），均显示为阴性，说明本研究建立的 cELISA 方法特异性良好，与其他牛源病原抗体不发生交叉反应。

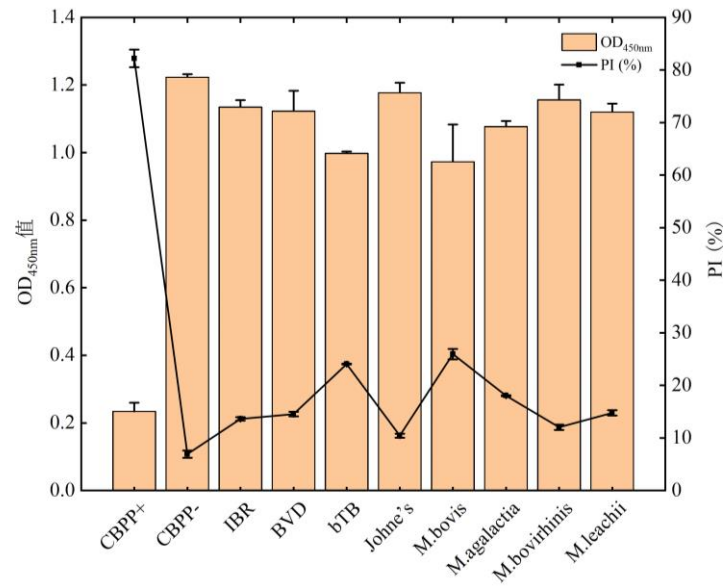


图 4-4 cELISA 方法的交叉反应性试验结果

Fig. 4-4 Results of cross-reactivity test for cELISA method

4.3.6 敏感性和最小检出量试验分析结果

(1) 利用该方法检测 70 份 CBPP 已知阳性血清，检测结果显示 57 份血清 PI > 44.77% 为阳性，显示该方法的敏感性为 81.4% (57/70)。

(2) 用已建立的 cELISA 方法对倍比稀释后的 3 份 CBPP 阳性血清进行检测，结果如图 4-5 所示，血清作 1:160 稀释时，PI > 44.77%，为阳性；而作 1:320 稀释时，PI < 44.77%，为阴性，说明该方法能检出阳性血清的最大血清稀释度为 1:160。

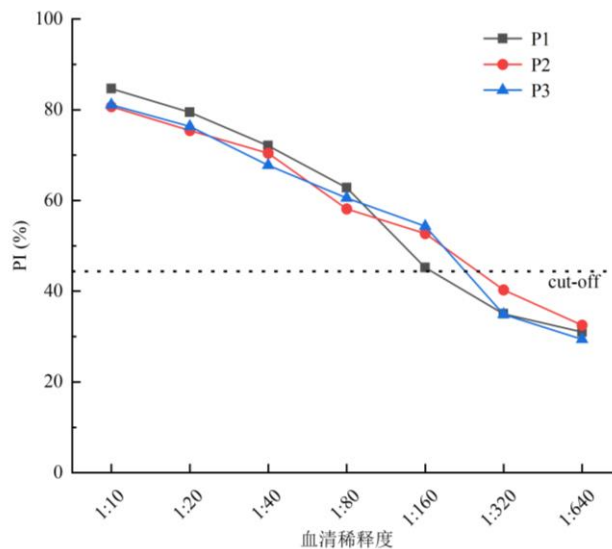


图 4-5 cELISA 方法的灵敏度测定结果

Fig. 4-5 Results of sensitivity determination of cELISA method

4.3.7 重复性试验分析结果

分析实验结果,检测 6 份 CBPP 血清样品的批内重复性试验组 CV 值在 2.29% ~ 5.72% 之间(表 4-7), 批间重复性试验组 CV 值在 3.30% ~ 9.84% 之间(表 4-8), 均小于 10%, 说明本研究建立的 cELISA 方法稳定、重复性良好。

表 4-7 批内重复性试验结果

Table 4-7 Intra-batch repeatability test results

血清编号	同一批次 PI (%)			平均值 (%)	标准差	变异系数 (%)
	板 1	板 2	板 3			
P1	75.90	82.44	79.80	79.38	2.685	3.38
P2	90.30	88.29	85.39	87.99	2.019	2.29
P3	68.33	75.47	76.06	73.29	3.517	4.80
N1	3.43	3.61	3.63	3.56	0.088	2.48
N2	8.88	7.97	9.13	8.66	0.496	5.72
N3	12.34	13.22	13.46	13.01	0.480	3.69

表 4-8 批间重复性试验结果

Table 4-8 Inter-batch repeatability test results

血清编号	不同批次 PI (%)			平均值 (%)	标准差	变异系数 (%)
	第 1 批	第 2 批	第 3 批			
P1	76.85	69.51	82.29	76.22	5.236	6.87
P2	83.43	89.80	84.25	85.83	2.831	3.30
P3	77.70	69.40	81.29	76.13	4.980	6.54
N1	5.33	5.84	4.58	5.25	0.516	9.84
N2	8.04	7.13	7.29	7.49	0.398	5.31
N3	15.47	13.24	13.79	14.17	0.948	6.69

4.3.8 符合率试验分析结果

利用建立的 cELISA 方法和 CBPP 抗体检测试剂盒(IDEXX)同时检测 1408 份临床血清样本, 检测结果如表 4-9 所示, 其中阳性血清的符合率为 80.43% (37/46), 阴性血清的符合率为 94.13% (1282/1362), 该方法与 IDEXX 检测试剂盒的总体符合率为 93.68% ((37+1282)/1408)。

表 4-9 cELISA 方法与 OIE 指定商品化试剂盒检测符合率试验结果

Table 4-9 Conformity test results of cELISA method and OIE recommended kit

临床样品	IDEXX CBPP 抗体检测试剂盒		总计	
	阳性	阴性		
本研究 cELISA 方法	阳性	37	80	117
	阴性	9	1282	1291
	总计	46	1362	1408
符合率 (%)	80.43	94.13		93.68

4.4 讨论

目前,除了非洲和亚洲的一些地区外,全世界大多数国家都被认为无 CBPP(EGWU et al., 1996; NICHOLAS et al., 2000)。在撒哈拉以南的非洲地区,如肯尼亚、坦桑尼亚、尼日尔、埃塞俄比亚等国家 CBPP 仍在肆虐,给国民经济造成重大损失,严重影响这些国家的粮食安全和人民生活(WINDSOR, 2000; BOLSKE et al., 1995; ABDELA et al., 2017; YANSAMBOU et al., 2018)。在亚洲的一些地区,如在我国毗邻的巴基斯坦, CBPP 也时有发生和流行,根据内部往来的未公开数据显示,该病在旁遮普邦流行率为 8%左右,屠宰场经常发现肺脏有典型病变的牛(ANJUM et al., 2020)。由于我国牛肉产品需求量大,市场供不应求,我国周边国家非法入境牛的现象屡禁不止,给我国养牛业的健康发展带来极大的安全隐患。CBPP 潜伏期长,常呈亚急性及慢性或无临床症状感染,而且使用抗生素治疗后慢性感染者可长期携带病原菌,严重阻碍了 CBPP 的诊断(THIAUCOURT et al., 2004; 辛九庆, 2007⁴)。一旦 CBPP 爆发,势必带来毁灭性的打击。我国当前缺少准确高效的 CBPP 诊断产品,严重制约着 CBPP 的有效监测和防控,开发敏感、特异、准确的 CBPP 诊断方法迫在眉睫。

CBPP 诊断基于临床症状、病原分离、血清学检测和尸检结果(RADOSTITS et al., 2007; OIE, 2018)。而血清学诊断在 CBPP 的调查和控制中发挥关键作用, OIE 目前推荐两种方法用于 CBPP 的筛查和根除,即 cELISA 和 CFT(OIE, 2018)。两种测试具有相似的灵敏度(约 63%)和特异性(98% ~ 99%),但两者均仅在畜群水平有效。其中 CFT 在急性病变期相当敏感,而在急性期后敏感性显著降低,感染后 3 个月变得不敏感(ABDO et al., 1998),而 cELISA 在慢性感染期更敏感(OIE, 2018)。尽管这两种血清学检测方法的敏感性能相互补充,但根据临床数据显示它们仍然不能提供足够的诊断确定性(FAO, 2003)。免疫印迹作为第三种测试也被推荐作为确证试验。它在 CBPP 无疫国家特别有用,而在没有其他确证结果的情况下,所有阳性结果都可能是假阳性(TARDY et al., 2011)。由于单一血清学检测方法无法检出所有感染阶段的 CBPP,建议使用多种方法测定(MUUKA et al., 2011)。CFT 方法对使用的抗原和新鲜红细胞有不同要求,操作人员也要求是熟练的技术人员,很难标准化,并且非特异性抗体在实际应用中对试验干扰极为明显且很难避免,因此难以大规模推广应用。cELISA 方法作为一种简便、快速、高通量的方法,在 CBPP 血清学检测中广泛使用。但由于现有的 cELISA 方法敏感性有限,仍需要改进、开发易于使用并且能够检测疾病所有阶段的诊断方法。

支原体表面脂蛋白对于诊断应用和研究 Mmm 致病性都具有极强的吸引力(PILO et al.,

2003)。迄今为止,众多学者对 Mmm 的表面脂蛋白已经进行了深入研究。其中, LppQ 是 Mmm 的一种特异性的高抗原性脂蛋白,基于对 LppQ 的研究以及对 LppQ 作为抗原的 ELISA 检测方法的研究发现,可以看出其可作为诊断的靶标 (BRUDERER et al., 2002)。然而,在 Mmm 预测的 187 种表面蛋白中,发现许多抗原也能触发抗体介导的免疫反应,与 LppQ 相比可能具有更强的免疫原性,可作为诊断的靶标 (HAMSTEN et al., 2009)。Neiman 等 (2009) 研制了包含 8 种抗原的鸡尾酒 ELISA 方法,通过多种抗原组合有效规避了交叉反应性,可检测大量表面蛋白介导的体液免疫反应,呈现出更高的特异性和灵敏度。该方法对 100 多个血清样本的检测结果显示出较好的敏感性和特异性,分别为 85.6% 和 96.4% (NEIMAN et al., 2009)。然而,尚需要对大量来自不同地理来源的牛血清进行评估,优化阳性阈值以确定该方法更准确可靠的敏感性和特异性。随后其他学者也陆续报道了基于不同重组蛋白的间接 ELISA 方法,显示了一定应用前景,但后续均未见有临床应用的报道,也没有商品化产品的出现 (BRUDERER et al., 2002; 辛九庆 等, 2006; 闫磊 等, 2019; 郝文君 等, 2020)。近十年来,本实验室陆续研究了数十种基于重组蛋白的间接 ELISA 方法,但在临床检测时敏感性不足。国外学者 Le Goff 等 (1998) 在 1998 年制备获得了 1 株特异性 Mmm 单克隆抗体,基于该单抗建立的 cELISA 方法特异性达 99.9%,敏感性与 CFT 相似,经过国际评估,目前已被 OIE 推荐为国际贸易指定的 CBPP 抗体检测方法。由于 CBPP 的临床诊断非常复杂,目前还没有任何一种方法能适用于所有情况下的 CBPP 检疫,而且各种诊断技术只能相互补充,需联合不同诊断方法进行更准确地判断。

本研究建立的 CBPP 抗体检测方法在提高 CBPP 诊断准确性的同时也具有良好的特异性。Western blot 结果显示 MAb 3C4A1 与常存在交叉反应的牛源性支原体抗原都不发生反应。同时,本研究特异性试验所使用的临床血清来自本实验室保存的 CBPP 流行病学监测样品,均为阴性。而且这些血清来源地区多年来均为 CBPP 阴性,从未发现临床感染病例,因此该检测方法 97.6% 的特异性具有很高的准确性。但由于无法获得大量的已知阳性参照血清的属性,只能以商品化试剂盒的检测结果为依据确定临界值和敏感性,考虑到商品化 cELISA 试剂盒 63.8% 的敏感性和 99.9% 的特异性 (MOLLA et al., 2021),因此本方法的敏感性会受到试剂盒敏感性的影响,可能存在一定的误差。

利用本实验建立的 cELISA 方法和 IDEXX 商品化检测试剂盒同时对来自不同地区的 1408 份临床牛血清进行检测和比较,结果显示两种方法的阳性血清符合率为 80.43%,阴性血清符合率为 94.13%。根据本团队在国际合作项目中分享的具有明确信息的牛血清样品,在来自赞比亚试验感染牛且剖检发现 CBPP 典型病变的 6 份血清中,IDEXX 检出 3 份阳性而本方法检出 5 份阳性;而对于试验感染但剖检无病变的 4 份牛血清样本,IDEXX 检出 4 份阳性而本方法检出 2 份阳性。结合感染方式和剖检病变来看,这 10 份血清可能来源于感染的不同阶段,具有典型病变的样本可能处于感染的急性期,而无病变的牛可能处于亚临床感染或慢性感染期,基于在这些样品中不同的检出结果,推测本研究建立的方法在急性期感染的敏感性高于 IDEXX 检测试剂盒,而在慢性感染或亚临床感染中的敏感性低于 IDEXX 检测试剂盒。鉴于有明确信息的血清样本量太少,不能准确反应出本研究所建立 cELISA 方法的性能。所以,尚需要对大量来自不同地区来源的牛血清进行评估,以确定该方法更准确可靠的敏感性和特异性 (HAMSTEN et al., 2009)。

近年来,单克隆抗体在我国动物疾病检测与诊断方面获得了充分的应用。因其特异性强、灵敏度高,能够显著提高抗原抗体反应的特异性,减少检测过程中可能出现的交叉反应,所以单抗

在抗原抗体检测方面具有独特的优势。本研究以单抗为基础建立了一种 CBPP 竞争 ELISA 抗体检测方法，显示了良好的特异性和稳定性，而且该方法简单易操作，检测时间短，可应用于实验室对临床 CBPP 血清样本的高通量检测。此外，本研究建立的方法与商品化试剂盒（IDEXX）检测结果较一致，符合率也较高，可替代进口产品，不仅为我国 CBPP 诊断和监测提供有效的技术手段，也在 CBPP 防控中发挥重要的作用。

第五章 结论

1、通过大肠杆菌表达系统表达出大量可溶性的 rM0071 蛋白，采用镍柱亲和层析纯化获得纯度良好的重组蛋白，其与 CBPP 阳性牛血清发生特异性反应证实 rM0071 蛋白具有良好的免疫反应性，可作为制备单抗的优势免疫原。

2、将 rM0071 蛋白免疫 BALB/c 小鼠的脾细胞与 SP2/0 细胞融合，通过间接 ELISA 方法筛选阳性克隆、有限稀释法亚克隆，获得 1 株针对 Mmm 的特异性单克隆抗体 (MAb 3C4A1)。成功制备酶标抗体 HRP-3C4A1。

3、建立了基于 HRP-3C4A1 的 CBPP 竞争 ELISA 抗体检测方法，该方法的敏感性为 81.4%、特异性为 97.6%，与商品化试剂盒符合率为 93.68%，具有一定临床应用价值。

参考文献

- 陈海东, 2019. 牛传染性胸膜肺炎诊断与防治. 中国畜禽种业, 15(01): 148. DOI: CNKI:SUN:XMZY.0.2019-01-123.
- 董克亮, 钟武钦, 2021. 牛肺疫的诊断与防治. 兽医导刊(19): 21-22.
- 高明东, 2017. 牛肺疫的病理形态学表现. 现代畜牧科(08): 152. DOI: 10.19369/j.cnki.2095-9737.2017.08.142.
- 郭元洪, 汪润华, 2017. 牛肺疫的诊断方法. 现代畜牧科技(10): 86. DOI: 10.19369/j.cnki.2095-9737.2017.10.078.
- 郝文君, 2020. 牛传染性胸膜肺炎抗体间接ELISA检测方法的建立及初步应用. 中国农业科学院. DOI: 10.27630/d.cnki.gznky.2020.000904.
- 郝文君, 李媛, 周效乾, 王秀梅, 辛九庆, 2020. 牛传染性胸膜肺炎抗体间接 ELISA 检测方法的建立. 畜牧兽医学报, 51(02): 329-336. DOI: 10.11843/j.issn.0366-6964.2020.02.014.
- 贾博, 2021. 牛肺疫的临床症状及防控方法. 兽医导刊(11): 48-49.
- 李秀美, 2018. 牛肺疫的诊断与防控措施. 畜牧兽医科技信息(06): 71. DOI: CNKI:SUN:XMKX.0.2018-06-060.
- 世界动物卫生组织, 2012. OIE 陆生动物诊断试验与疫苗手册. 第 7 版, 北京: 中国农业出版社.
- 唐威华, 张景六, 王宗阳, 洪孟民, 2000. SDS-PAGE 法测定 His-tag 融合蛋白分子量产生偏差的原因. 植物生理学报, 26(1): 64-68.
- 王丛丛, 2021. 禽流感病毒H7亚型C-ELISA抗体检测方法的建立及其初步应用. 中国农业科学院. DOI: 10.27630/d.cnki.gznky.2021.000235.
- 王栋, 刘众心, 张立春, 1991. 微量补体结合试验诊断牛肺疫的研究. 中国畜禽传染病(04): 28-30.
- 王夫天, 2018. 牛传染性胸膜肺炎的流行与防控. 畜牧兽医科技信息(05): 82. DOI: CNKI:SUN:XMKX.0.2018-05-066.
- 吴庭训, 2005. 牛肺疫兔化弱毒菌苗、兔化绵羊适应菌苗和微量凝集诊断技术. 黑龙江省, 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, -01-01.
- 吴移谋, 叶元康, 宁宜宝, 寿成超, 毕丁任, 武济民, 2008. 支原体学. 第 2 版, 北京: 人民卫生出版社.
- 吴裕祥, 张红星, 1988. 微量凝集试验诊断牛肺疫的研究 I. 对牛肺疫苗苗接种牛诊断的研究. 中国畜禽传染病(02): 24-27.
- 辛九庆, 2007. 牛传染性胸膜肺炎诊断技术与分子流行病学研究. 吉林农业大学. DOI: 10.7666/d.y1199074.
- 辛九庆, 高玉龙, 李媛, 王砚范, 钱爱东, 2006. 应用重组抗原建立检测牛传染性胸膜肺炎的间接 ELISA 方法. 中国农业科学(01): 181-186. DOI: 10.3321/j.issn:0578-1752.2006.01.026.
- 辛九庆, 高玉龙, 杨婉容, 王砚范, 2002. 丝状支原体丝状亚种 SC 生物型 PCR 检测方法的建议. 中国预防兽医学报(06): 54-56. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0589.2002.06.015.
- 辛九庆, 胡守萍, 杨婉容, 高玉龙, 2003. 牛传染性胸膜肺炎研究进展. 中国奶牛(01): 42-45. DOI:

- 10.3969/j.issn.1004-4264.2003.01.019.
- 徐洪伟, 2019. 牛肺疫的发病机理及防治方法. 畜牧兽医科技信息(03): 63. DOI: CNKI:SUN: XMKX.0.2019-03-056.
- 闫磊, 潘巧, 赵雅芝, 郝文君, 李媛, 辛九庆, 2019. 基于丝状支原体丝状亚种 P35 反应原性的验证及其间接 ELISA 方法的建立. 中国预防兽医学报, 41(07): 716-720. DOI: CNKI:SUN:ZGXQ.0.2019-07-010.
- 叶德成, 吴海杰, 2018. 牛传染性胸膜肺炎研究进展. 中国畜牧兽医文摘, 34(06): 194. DOI: CNKI: SUN:ZXWA.0.2018-06-176.
- 袁敏明, 2021. 牛肺疫的诊断要点及防治措施. 畜牧兽医科技信息(02): 125. DOI: 10.3969/J.ISSN.1671-6027.2021.02.114.
- 张德昆, 吴芳东, 1992. 牛肺疫血清学诊断方法对比-微量凝集与补体结合试验. 新疆畜牧业(04): 35-36. DOI: 10.16795/j.cnki.xjxmy.1992.04.016.
- ABDELA N, YUNE N, 2017. Seroprevalence and distribution of contagious bovine pleuropneumonia in ethiopia: update and critical analysis of 20 years (1996-2016) reports. Front VetSci, 4: 100. DOI: 10.3389/fvets.2017.00100.
- ABDO E M, NICOLET J, FREY J, 2000. Antigenic and genetic characterization of lipoprotein LppQ from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. Clin Diagn Lab Immunol, 7(4): 588-595. DOI: 10.1128/CDLI.7.4.588-595.2000.
- ABDO E M, NICOLET J, MISEREZ R, GONCALVES R, REGALLA J, GRIOT C, BENSAIDE A, KRAMPE M, FREY J, 1998. Humoral and bronchial immune responses in cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. Vet Microbiol, 59(2-3): 109-122. DOI: 10.1016/s0378-1135(97)00184-3.
- ANJUM A, USMAN S, ASLAM A, FAIZ M, USMAN S, IMRAN M S, HUSSAIN I, USMAN M, BADAR S, IQBAL M Z, DAR A, HAQ H M A, 2020. Prevalence and molecular detection of contagious bovine pleuropneumonia in large ruminants in Punjab, Pakistan. Trop Biomed, 37(2): 273-281.
- ANYIKA K C, OKAIYETO S O, SACKKEY A K B, KWANASHIE C N, LUKA P D, ANKELI P I, 2021. Isolation and identification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* in cattle from south-east Nigeria. Open Vet J, 11(1): 174-179. DOI: 10.4314/ovj.v11i1.25.
- AYE R, MWIRIGI M K, FREY J, PILO P, JORES J, NAESSENS J, 2015. Cyto-adherence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* to bovine lung epithelial cells. BMC Vet Res, 11: 27. DOI: 10.1186/s12917-015-0347-3.
- BASHIRUDDIN J B, DE SANTIS P, VACCIANA A, SANTINI F G, 1999. Detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC in clinical material by a rapid colorimetric PCR. Mol Cell Probes, 13(1): 23-28. DOI: 10.1006/mcpr.1998.0206.
- BASHIRUDDIN J B, TAYLOR T K, GOULD A R, 1994. A PCR-based test for the specific identification of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. J Vet Diagn Invest, 6(4): 428-434. DOI: 10.1177/104063879400600405.

- BOLSKE G, MSAMI H M, GUNNARSSON A, KAPAGA A M, LOOMU P M, 1995. Contagious bovine pleuropneumonia in northern Tanzania, culture confirmation and serological studies. *Trop Anim Health Prod*, 27(4): 193-201. DOI: 10.1007/BF02250690.
- BONVIN-KLOTZ L, VILEI E M, KUHN-BOGHENBOR K, KAPP N, FREY J, STOFFEL M H, 2008. Domain analysis of lipoprotein LppQ in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93(1-2): 175-183. DOI: 10.1007/s10482-007-9191-1.
- BROCCHI E, GAMBA D, POUMARAT F, MARTEL J L, DE SIMONE F, 1993. Improvements in the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia through the use of monoclonal antibodies. *Rev Sci Tech*, 12(2): 559-570. DOI: 10.20506/rst.12.2.702.
- BROOKS C, FINLAY D, BLACKBURN P, BALL H J, 2009. Detection of *Mycoplasma mycoides* sub-species *mycoides* small colony by a specific capture/enrichment monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *Res Vet Sci*, 87(2): 200-203. DOI: 10.1016/j.rvsc.2009.03.007.
- BRUDERER U, REGALLA J, ABDO EL-M, HUEBSCHLE O J, FREY J, 2002. Serodiagnosis and monitoring of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) with an indirect ELISA based on the specific lipoprotein LppQ of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet Microbiol*, 84(3): 195-205. DOI: 10.1016/s0378-1135(01)00466-7.
- BUTTERY S H, LLOYD L C, TITCHEN D A, 1976. Acute respiratory, circulatory and pathological changes in the calf after intravenous injections of the galactan from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *J Med Microbiol*, 9(4): 379-391. DOI: 10.1099/00222615-9-4-379.
- BYGRAVE A C, MOULTON J E, SHIFRINE M, 1968. Clinical, serological and pathological findings in an outbreak of contagious bovine pleuropneumonia. *Bull Epizoot Dis Afr*, 16(1): 21-46.
- CHURCHWARD C P, HLUSEK M, NICHOLAS R A, AYLING R D, MC AULIFFE L, 2012. A simplified PCR method for genotyping *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony: the aetiological agent of contagious bovine pleuropneumonia. *Vet Microbiol*, 159(1-2): 257-259. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.03.011.
- DEDIEU L, BREARD A, LE GOFF C, LEFEVRE P C, 1996. Diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia: problems and recent developments. *Rev Sci Tech*, 15(4): 1331-1353.
- DEDIEU L, TOTTE P, RODRIGUES V, VILEI E M, FREY J, 2010. Comparative analysis of four lipoproteins from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony identifies LppA as a major T-cell antigen. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 33(4): 279-290. DOI: 10.1016/j.cimid.2008.08.011.
- DI TEODORO G, MARRUCHELLA G, DI PROVVIDO A, DANGELO A R, ORSINI G, DI GIUSEPPE P, SACCHINI F, SCACCHIA M, 2020. Contagious bovine pleuropneumonia: A comprehensive overview. *Vet Pathol*, 57(4): 476-489. DOI: 10.1177/0300985820921818.
- DUPUY V, MANSO-SILVAN L, BARBE V, THEBAULT P, DORDET-FRISONI E, CITTI C, POUMARAT F, BLANCHARD A, BRETON M, SIRAND-PUGNET P, THIAUCOURT F, 2012. Evolutionary history of contagious bovine pleuropneumonia using next generation sequencing of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* "small colony". *PLoS One*, 7(10): e46821. DOI: 10.1371/

- journal.pone.0046821.
- EGWU G O, NICHOLAS R A J, AMEH J, BASHIRUDDIN J B, 1996. Contagious bovine pleuropneumonia: an update. *Vet Bull*: 875-888.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2003. Contagious bovine pleuropneumonia, third meeting of the consultative group on contagious bovine pleuropneumonia. *Dis Bull*, 24: 2-7.
- GRIECO V, BOLDINI M, LUINI M, FINAZZI M, MANDELLI G, SCANZIANI E, 2001. Pathological, immunohistochemical and bacteriological findings in kidneys of cattle with contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *J Comp Pathol*, 124(2-3): 95-101. DOI: 10.1053/jcpa.2000.0433.
- GRIFFIN D, 2010. Bovine pasteurellosis and other bacterial infections of the respiratory tract. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 26(1): 57-71. DOI: 10.1016/j.cvfa.2009.10.010.
- HAMSTEN C, NEIMAN M, SCHWENK J M, HAMSTEN M, MARCH J B, PERSSON A, 2009. Recombinant surface proteomics as a tool to analyze humoral immune responses in bovines infected by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Mol Cell Proteomics*, 8(11): 2544-2554. DOI: 10.1074/mcp.M900009-MCP200.
- HWANG Y S, PANANGALA V S, ROSSI C R, GIAMBRONE J J, LAUERMAN L H, 1989. Monoclonal antibodies that recognize specific antigens of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. *Avian Dis*, 33(1): 42-52.
- JAN G, FONTENELLE C, VERRIER F, LE HENAFF M, WROBLEWSKI H, 1996. Selective acylation of plasma membrane proteins of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, the contagious bovine pleuropneumonia agent. *Curr Microbiol*, 32(1): 38-42. DOI: 10.1007/s002849900007.
- JUNGI T W, KRAMPE M, SILEGHEM M, GRIOT C, NICOLET J, 1996. Differential and strain-specific triggering of bovine alveolar macrophage effector functions by mycoplasmas. *Microb Pathog*, 21(6): 487-498. DOI: 10.1006/mpat.1996.0078.
- KOPPEL P, PETERHANS E, BERTONI G, KEIST R, GROSCURTH P, WYLER R, KELLER R, 1984. Induction of chemiluminescence during interaction of tumoricidal effector cell populations and tumor cells is dependent on the presence of mycoplasma. *J Immunol*, 132(4): 2021-2029.
- LE GOFF C, THIAUCOURT F, 1998. A competitive ELISA for the specific diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Vet Microbiol*, 60(2-4): 179-191. DOI: 10.1016/s0378-1135(98)00156-4.
- LI Y, WANG Y, WANG R, ZHU Y, LIU S, WANG Q, SHAO J, CHEN Y, GAO L, ZHOU C, LIU H, WANG X, ZHENG H, XIN J, 2016. Changes in pathogenicity and immunogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* strains revealed by comparative genomics analysis. *Sci Rep*, 6: 19081. DOI: 10.1038/srep19081.
- LI Y, XIN J, GAO Y, ZHANG J, NICHOLAS R A, LIN Y, 2009. Strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type isolated in China between 1953 and 1960 show close similarity to strains of the Africa/Australia cluster. *Vet J*, 179(1): 137-141. DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.08.021.

- LUCIANI M, ARMILLOTTA G, MANNA L, CIARELLI A, DI FEBBO T, KRASTEVA I, PINI A, SACCHINI F, D'ANGELO A R, 2016. Selection of a monoclonal antibody by ELISA, immunoblotting and quartz crystal microbalance technology for immunohistochemical detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. Epub ahead of print. DOI: 10.12834/VetIt.435.2084.2.
- MAROBELA-RABOROKGWE C, NICHOLAS R, AYLING R, BASHIRUDDIN J B, 2003. Comparison of complement fixation test, immunoblotting, indirect ELISA, and competitive ELISA for detecting antibodies to *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony (SC) in naturally infected cattle from the 1995 outbreak in Botswana. Onderstepoort J Vet Res, 70(1): 21-27.
- MAUNSELL F P, WOOLUMS A R, FRANCOZ D, ROSENBUSCH R F, STEP D L, WILSON D J, JANZEN E D, 2011. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. J Vet Intern Med, 25(4): 772-783. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2011.0750.x.
- MBULU R S, TJIPURA-ZAIRE G, LELLI R, FREY J, PILO P, VILEI E M, METTLER F, NICHOLAS R A, HUEBSCHLE O J, 2004. Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) caused by vaccine strain T1/44 of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. Vet Microbiol, 98(3-4): 229-734. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.11.007.
- MC AULIFFE L, AYLING R D, NICHOLAS R A, 2007. Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for the molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. FEMS Microbiol Lett, 276(2): 181-188. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00936.x.
- MILNE G, ALLEN A, GRAHAM J, LAHUERTA-MARIN A, MC CORMICK C, PRESHO E, REID N, SKUCE R, BYRNE A W, 2020. Bovine tuberculosis breakdown duration in cattle herds: an investigation of herd, host, pathogen and wildlife risk factors. PeerJ, 8: e8319. DOI: 10.7717/peerj.8319.
- MITCHELL J D, GOH S, MC KELLAR Q A, MC KEEVER D J, 2013. In vitro pharmacodynamics of gamithromycin against *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony. Vet J, 197(3): 806-811. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.05.025.
- MOLLA W, JEMBERU W T, MEKONNEN S A, TULI G, ALMAW G, 2021. Seroprevalence and risk factors of contagious bovine pleuropneumonia in selected districts of North Gondar Zone, Ethiopia. Front Vet Sci, 8: 626253. DOI: 10.3389/fvets.2021.626253.
- MULONGO M, FREY J, SMITH K, SCHNIER C, WESONGA H, NAESSENS J, MC KEEVER D, 2015. Vaccination of cattle with the N terminus of LppQ of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* results in type III immune complex disease upon experimental infection. Infect Immun, 83(5): 1992-2000. DOI: 10.1128/IAI.00003-15.
- MUUKA G, HANG'OMBE B M, NALUBAMBA K S, KABILIKA S, MWAMBAZI L, MUMA J B, 2011. Comparison of complement fixation test, competitive ELISA and LppQ ELISA with post-mortem findings in the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). Trop Anim Health Prod, 43(5): 1057-1062. DOI: 10.1007/s11250-011-9805-5.
- MUUKA G, SONGOLO N, KABILIKA S, HANG'OMBE B M, NALUBAMBA K S, MUMA J B,

2013. Challenges of controlling contagious bovine pleuropneumonia in sub-Saharan Africa: a Zambian perspective. *Trop Anim Health Prod*, 45(1): 9-15. DOI: 10.1007/s11250-012-0235-9.
- MWIRIGI M, NKANDO I, OLUM M, ATTAH-POKU S, OCHANDA H, BERBEROV E, POTTER A, GERDTS V, PEREZ-CASAL J, WESONGA H, SOI R, NAESSENS J, 2016. Capsular polysaccharide from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* shows potential for protection against contagious bovine pleuropneumonia. *Vet Immunol Immunopathol*, 178: 64-69. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.07.002.
- NEIMAN M, HAMSTEN C, SCHWENK J M, BOLSKE G, PERSSON A, 2009. Multiplex screening of surface proteins from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony for an antigen cocktail enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Vaccine Immunol*, 16(11): 1665-1674. DOI: 10.1128/CVI.00223-09.
- NGUYEN Q T, YANG J, BYUN J W, PYO H M, PARK M Y, KU B K, NAH J, RYOO S, WEE S H, CHOI K S, POO H, 2019. Development of monoclonal antibody specific to foot-and-mouth disease virus type A for serodiagnosis. *Pathogens*, 8(4): 301. DOI: 10.3390/pathogens8040301.
- NIANG M, DIALLO M, CISSE O, KONE M, DOUCOURE M, ROTH J A, BALCER-RODRIGUES V, DEDIEU L, 2006. Pulmonary and serum antibody responses elicited in zebu cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC by contact exposure. *Vet Res*, 37(5): 733-744. DOI: 10.1051/vetres:2006032.
- NICHOLAS R A, BASHIRUDDIN J B, 1995. *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* (small colony variant): the agent of contagious bovine pleuropneumonia and member of the "mycoplasma mycoides cluster". *J Comp Pathol*, 113(1): 1-27. DOI: 10.1016/s0021-9975(05)80065-9.
- NICHOLAS R, BASHIRUDDIN J, AYLING R, MILES R, 2000. Contagious bovine pleuropneumonia: a review of recent developments. *Vet Bull*: 827-838.
- NIE A, SUN B, FU Z, YU D, 2019. Roles of aminoacyl-tRNA synthetases in immune regulation and immune diseases. *Cell Death Dis*, 10(12): 901. DOI: 10.1038/s41419-019-2145-5.
- NOCARD, ROUX, 1990. The microbe of pleuropneumonia. 1896. *Rev Infect Dis*, 12(2): 354-358. DOI: 10.1093/clinids/12.2.354.
- OIE, 2018. Contagious bovine pleuropneumonia (infection with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Available online at: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.08.
- ONOVIRAN O, TAYLOR-ROBINSON D, 1979. Detection of antibody against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* in cattle by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Rec*, 105(8): 165-166. DOI: 10.1136/vr.105.8.165.
- PERSSON A, JACOBSSON K, FRYKBERG L, JOHANSSON K E, POUMARAT F, 2002. Variable surface protein Vmm of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *J Bacteriol*, 184(13): 3712-3722. DOI: 10.1128/JB.184.13.3712-3722.2002.
- PILO P, FREY J, VILEI E M, 2007. Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet J*, 174(3): 513-521. DOI: 10.1016/j.tvjl.2006.10.016.

- PILO P, MARTIG S, FREY J, VILEI E M, 2003. Antigenic and genetic characterisation of lipoprotein LppC from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet Res*, 34(6): 761-775. DOI: 10.1051/vetres:2003035.
- PILO P, VILEI E M, PETERHANS E, BONVIN-KLOTZ L, STOFFEL M H, DOBBELAERE D, FREY J, 2005. A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *J Bacteriol*, 187(19): 6824-6831. DOI: 10.1128/JB.187.19.6824-6831.2005.
- POUMARAT F, SOLSONA M, 1995. Molecular epidemiology of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype Small Colony, the agent of contagious bovine pleuropneumonia. *Vet Microbiol*, 47(3-4): 305-315. DOI: 10.1016/0378-1135(95)00115-8.
- RADOSTITS O M, GAY C C, HINCHCLIFF K W, CONSTABLE P D, 2007. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 10th ed. Edinburgh: Saunders Elsevier, 1125-1131.
- RAZIN S, 1997. The minimal cellular genome of mycoplasma. *Indian J Biochem Biophys*, 34(1-2): 124-130.
- RAZIN S, YOGEV D, NAOT Y, 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(4): 1094-1156. DOI: 10.1128/MMBR.62.4.1094-1156.1998.
- REGALLA J, 1995. Complement fixation reaction for the serologic diagnosis of bovine contagious pleuropneumonia: application and interpretation of the results. *Rev Sci Tech*, 14(3): 631-644.
- REGALLA J, CAPORALE V, GIOVANNINI A, SANTINI F, MARTEL J L, GONCALVES A P, 1996. Manifestation and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Europe. *Rev Sci Tech*, 15(4): 1309-1329. DOI: 10.20506/rst.15.4.979.
- RODRIGUEZ F, BALL H J, FINLAY D, CAMPBELL D, MACKIE D P, 1996. Detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* by monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *Vet Microbiol*, 51(1-2): 69-76. DOI: 10.1016/0378-1135(96)00018-1.
- RODRIGUEZ F, FERNANDEZ A, BALL H J, 1997. Detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* by growth-inhibition using monoclonal antibodies. *Res Vet Sci*, 63(1): 91-92. DOI: 10.1016/s0034-5288(97)90165-x.
- RYCROFT J A, GOLLAN B, GRABE G J, HALL A, CHEVERTON A M, LARROUY-MAUMUS G, HARE S A, HELAINE S, 2018. Activity of acetyltransferase toxins involved in *Salmonella* persistor formation during macrophage infection. *Nat Commun*, 9(1): 1993. DOI: 10.1038/s41467-018-04472-6.
- SACCHINI F, LILJANDER A M, HELLER M, POOLE E J, POSTHAUS H, SCHIECK E, JORES J, 2020. Reproduction of contagious bovine pleuropneumonia via aerosol-based challenge with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *Acta Vet Scand*, 62(1): 62. DOI: 10.1186/s13028-020-00560-0.
- SACCHINI F, NAESSENS J, AWINO E, HELLER M, HLINAK A, HAIDER W, STERNER-KOCK A, JORES J, 2011. A minor role of CD4+ T lymphocytes in the control of a primary infection of cattle with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *Vet Res*, 42(1): 77. DOI: 10.1186/1297-9716-42-77.
- SCANZIANI E, PALTRINIERI S, BOLDINI M, GRIECO V, MONACI C, GIUSTI A M, MANDELLI

- G, 1997. Histological and immunohistochemical findings in thoracic lymph nodes of cattle with contagious bovine pleuropneumonia. *J Comp Pathol*, 117(2): 127-136. DOI: 10.1016/s0021-9975(97)80029-1.
- SCHNEE C, HELLER M, JORES J, TOMASO H, NEUBAUER H, 2011. Assessment of a novel multiplex real-time PCR assay for the detection of the CBPP agent *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC through experimental infection in cattle. *BMC Vet Res*, 7: 47. DOI: 10.1186/1746-6148-7-47.
- SMITH G R, OLIPHANT J C, 1982. Some in-vitro characters of the subspecies of *Mycoplasma mycoides*. *J Hyg (Lond)*, 89(3): 521-527. DOI: 10.1017/s0022172400071096.
- TARDY F, GAURIVAUD P, MANSO-SILVAN L, THIAUCOURT F, PELLET M P, MERCIER P, LE G D, POUMARAT F, 2011. Extended surveillance for CBPP in a free country: Challenges and solutions regarding the potential caprine reservoir. *Prev Vet Med*, 101(1-2): 89-95. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2011.04.017.
- TER LAAK E A, 1992. Contagious bovine pleuropneumonia. A review. *Vet Q*, 14(3): 104-110. DOI: 10.1080/01652176.1992.9694343.
- THIAUCOURT F, ABOUBAKAR Y, WESONGA H, MANSO-SILVAN L, BLANCHARD A, 2004. Contagious bovine pleuropneumonia vaccines and control strategies: recent data. *Dev Biol (Basel)*, 119: 99-111.
- TRICHARD C J, BASSON P A, VAN DER LUGT J J, JACOBSZ E P, 1989. An outbreak of contagious bovine pleuropneumonia in the Owambo Mangetti area of south west Africa/Namibia: microbiological, immunofluorescent, pathological and serological findings. *Onderstepoort J Vet Res*, 56(4): 277-284.
- VARELA F, INACIO J, BOTELHO A, 2010. Molecular diversity assessed by VNTR and IS1296 typing of historical *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC strains. *Vet Microbiol*, 146(3-4): 295-302. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.05.030.
- VILEI E M, ABDO E M, NICOLET J, BOTELHO A, GONCALVES R, FREY J, 2000. Genomic and antigenic differences between the European and African/Australian clusters of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Microbiology (Reading)*, 146(Pt2): 477-486. DOI: 10.1099/00221287-146-2-477.
- VILEI E M, FREY J, 2004. Differential clustering of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC strains by PCR-REA of the bgl locus. *Vet Microbiol*, 100(3-4): 283-288. DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.02.005.
- WESTBERG J, PERSSON A, HOLMBERG A, GOESMANN A, LUNDEBERG J, JOHANSSON K E, PETTERSSON B, UHLEN M, 2004. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Res*, 14(2): 221-227. DOI: 10.1101/gr.1673304.
- WINDSOR R S, 2000. The eradication of contagious bovine pleuropneumonia from south western Africa. A plan for action. *Ann N Y Acad Sci*, 916: 326-332. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.

tb05309.x.

XIN J, LI Y, NICHOLAS R A, CHEN C, LIU Y, ZHANG M J, DONG H, 2012. A history of the prevalence and control of contagious bovine pleuropneumonia in China. *Vet J*, 191(2): 166-170. DOI: 10.1016/j.tvjl.2011.02.011.

YANSAMBOU M S, DIALLO A A, IDI M, GAGARA H, HAIDO A M, BADA ALAMBEDJI R, 2018. Serological prevalence of contagious bovine pleuropneumonia in Niger in 2017. *Front Vet Sci*, 5: 238. DOI: 10.3389/fvets.2018.00238.

ZHOU Y, WANG Y, LI Y, NICK N, ZOU X, BAI F, WU J, XIN J, 2016. P19 contributes to *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* adhesion to EBL cells. *Microb Pathog*, 93: 13-21. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.01.011.