

肉鸡滑液囊支原体的分离鉴定和药敏试验

刘春凌, 王鹏, 利凯 (河北北方学院动物科技学院, 河北张家口 075000)

摘要 通过分离培养张家口某鸡场 MS 菌株, 采用 PCR 方法扩增 MS 16S RNA, 并对分离培养菌株进行药敏试验。结果显示, 感染 MS 肉鸡站立困难, 跗关节和爪垫肿胀, 分离培养的病源体菌落为光滑、圆形, 小面积“煎蛋样”。PCR 产物在 207 bp 处出现条带。药敏试验发现该菌落对酒石酸泰乐菌素和延胡索酸泰妙菌素敏感, 最小抑菌浓度分别为 0.122 和 0.244 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。因此, 可确定该鸡场已感染滑液囊支原体, 推荐使用酒石酸泰乐菌素或延胡索酸泰妙菌素作为首选抑菌治疗药物。

关键词 滑液囊支原体; 分离; 鉴定; PCR; 药敏试验

中图分类号 S852.62 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)09-0092-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.09.023



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Isolation, Identification and Drug Sensitivity Test of *Mycoplasma synoviae* in Broiler

LIU Chun-ling, WANG Peng, LI Kai (School of Animal Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000)

Abstract *Mycoplasma synoviae* (MS) strains were isolated from a chicken farm in Zhangjiakou and cultured, PCR method was used to amplify 16S RNA of MS. And drug sensitivity test was made on the isolated stains. The results showed that broilers infected with MS had difficulty in standing, swelling of the tarsal joints and paw pads, and the isolated and cultured pathogen colonies were smooth, round, with “fried egg-like” small areas. PCR product showed a band at 207 bp. The drug susceptibility test showed that the colony was sensitive to tylosin tartrate and tiamulin fumarate, and the minimum inhibitory concentrations were 0.122 and 0.244 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Therefore, it could be determined that the chicken farm was infected with MS, and it was recommended to use tylosin tartrate or tiamulin fumarate as the first antibacterial medicine.

Key words *Mycoplasma synoviae*; Isolation; Identification; PCR; Drug sensitivity test

滑液囊支原体 (*Mycoplasma synoviae*, MS) 是鸡体中重要的致病性病原体之一, 通过呼吸道感染进入鸡只体内, 会导致鸡只生长发育迟缓和滑膜炎的发生, 同时容易与其他疾病混合感染, 加剧死亡, 给鸡场带来严重的经济损失^[1-2]。MS 同时具有水平传播和垂直传播的特性^[3-4]。目前防治肉鸡 MS 感染主要依靠抗生素, 但随着药物使用时间的延长和使用范围的扩大, 其防治效果将越来越差。笔者通过分离培养张家口某鸡场菌株, 采用特异性 PCR 检测和药敏试验, 结合临床症状和分离培养鉴别 MS, 并筛选出集中敏感药物, 以期对张家口地区 MS 病防治药物的合理使用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 培养基。支原体精氨酸肉汤培养基(产品编号 HB7025-5)、支原体琼脂培养基(编号 HB7025-3)、支原体肉汤培养基(产品编号 HB7025-2), 均购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂。血液/细胞/组织基因组总 RNA 提取试剂盒(产品编号 ZP311), 第一链反转录试剂盒-耐高温酶(产品编号 ZR102-1), 2 \times Ftaq PCR MasterMix(产品编号 ZT201-1), DL2000 DNA Marker(产品编号 ZM404-1), GoldViewTM 核酸染料 I(产品编号 ZS209), 均购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司; 标准小牛血清(产品编号 CS-XQ0301), 购自上海莼试生物技术有限公司。

1.1.3 药敏试验用药。延胡索酸泰妙菌素(批号为兽药字 300111320, 购自山东胜利生物工程有限公司), 磷酸替米考

星(批号为兽药字 190801599, 购自河北天象生物药业有限公司), 氟苯尼考(批号为兽药字 163231120, 购自华畜兽药有限公司), 盐酸环丙沙星(批号为兽药字 150512606, 购自山东鲁西兽药股份有限公司), 盐酸多西环素(批号为兽药字 163236011, 购自华畜兽药有限公司), 硫酸庆大霉素(批号为兽药原字 110132337, 购自华北制药有限责任公司), 盐酸林可霉素(批号为兽药字 161016081, 购自华畜兽药有限公司), 盐酸沙拉沙星(批号为兽药字 161012630, 购自华畜兽药有限公司), 酒石酸泰乐菌素(批号为兽药字 161012733, 购自华畜兽药有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 支原体分离、鉴定培养基的制作。严格按照支原体精氨酸肉汤培养基、支原体琼脂培养基和支原体肉汤培养基产品使用说明书配制这 3 种培养基, 高压灭菌, 冷却, 加灭活小牛血清 200 mL 和青霉素 80 万单位, 调节 pH, 加入无菌试管, 备用。

1.2.2 病料采集与保存。选取张家口某鸡场 20 只疑似感染 MS 的肉鸡, 观察其临床症状。无菌收集疑似感染 MS 肉鸡鼻孔、气管拭子、肿胀关节液, 编号标记, 接种于支原体精氨酸肉汤培养基, 密封保存。37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 36 h, 观察培养基颜色的变化。

1.2.3 菌落的分离培养。参照顾乐^[5]的 MS 分离鉴定步骤, 无菌抽取少量已经变黄的培养液, 确定无杂菌后将可疑培养物在相同的培养基中连续传代 7~8 代, 然后取 0.30 mL 培养物接种于支原体琼脂培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧环境下培养 12 d, 待肉眼可见菌落时挑取单菌落涂片, 吉姆萨染色后, 置于显微镜 10 \times 10 倍观察菌落形态, 并用灭菌注射器针头挑取典型单菌, 接种于培养基中传代培养。

1.2.4 PCR 鉴定。利用“1.2.3”中获取的分离菌株, 参照石

作者简介 刘春凌(1981—), 女, 河北石家庄人, 讲师, 硕士, 从事临床兽医学研究。

收稿日期 2020-10-11

晓磊等^[6]的试验方法,按照血液、细胞、组织基因组总 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA,并使用第一链反转录试剂盒转换为第一链 cDNA 作为模板,用 16S rRNA 基因通用引物 P₁ (5'-GAAGCAAATAGTGATATCA-3')和 P₂ (5'-GTCGTCTC-CGAAGTTAAACA-3')对分离菌的 16S rRNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 RNA 模板 0.5 μL, P₁ 和 P₂ 各 1 μL, 2×Ftaq PCR MasterMix 12.5 μL, 用双蒸水补至 25 μL。PCR 扩增程序如下:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 32 个循环;72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,预期扩增片段为 207 bp。采用琼脂糖凝胶电泳法检测扩增产物片段。

1.2.5 药敏试验。

1.2.5.1 抗菌药物的稀释。 无菌称取抗菌药物溶于稀释液中,配成浓度 10 mg/mL 的原液,再用液体培养基将药液稀释至 1 mg/mL,每种药物取 0.5 mL,于 38 °C 下培养 3 d 后观察,以确保无真菌或细菌污染。

1.2.5.2 常用抗菌药物最小抑菌浓度的测定。 参照石晓磊^[7]的试验方法,对张家口地区分离鉴定的 MS 进行最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 测定。在灭菌 EP 管中分别加入支原体肉汤培养基 0.4 mL, 每种药品 1 组, 每组 3 个重复, 每个重复 15 个梯度。于每组每个重复第 1 管加入上述抗生素溶液各 0.4 mL, 然后按 1:1 倍比稀释至第 15 管后弃去多余溶液, 再分别加入 40 μL 待测菌液。将第 16 管作为阴性对照 (培养基 0.4 mL), 第 17 管作为阳性对照 (培养基 0.4 mL+40 μL 待测菌液)。将稀释好的菌液移至 96 孔细胞培养板上, 加盖后置于 37 °C CO₂ 培养箱中观察 7 d。结果判定标准如下: 第 16 管不变色, 第 17 管由原来的无色变为黄色且清澈透明。观察试验孔的颜色变化, 记录无 MS 生长的最大稀释倍数, 根据药物稀释浓度计算菌株的最小抑菌浓度。

2 结果与分析

2.1 临床症状 经观察发现, 肉鸡站立困难, 跗关节、脚垫肿胀, 病鸡俯卧不起。

2.2 菌落特征 显微镜观察发现小面积、光滑、圆形、呈“煎蛋样”的致密菌落 (图 1)。

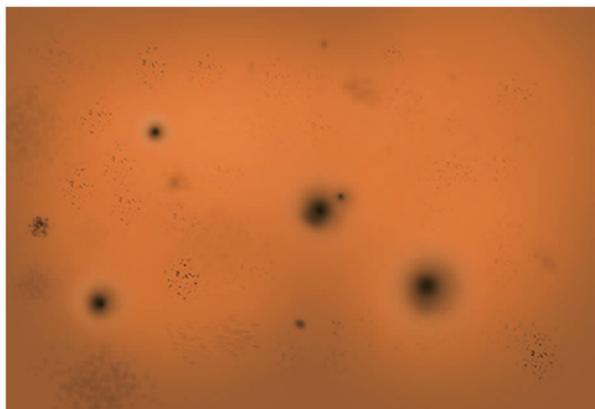


图 1 菌落形态

Fig. 1 The colony morphology

2.3 PCR 鉴定 PCR 扩增产物经凝胶电泳后, 可见在 207 bp 处出现条带 (图 2)。纯化菌株能扩增出特异性的鸡滑液囊支原体目的片段, 扩增片段与预测扩增片段相符。

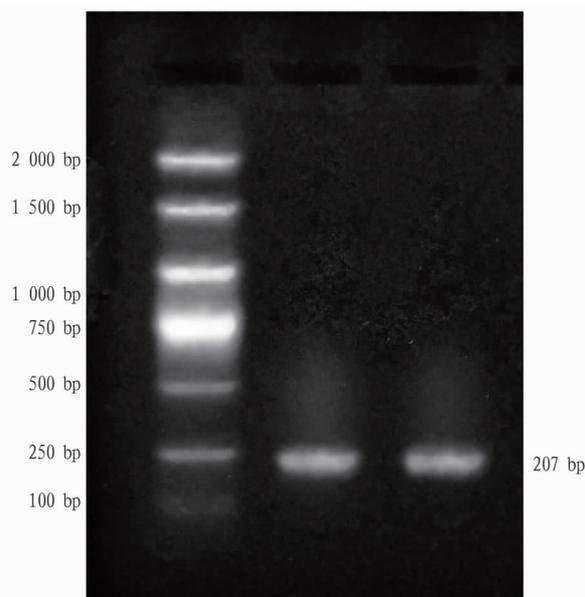


图 2 RT-PCR 产物凝胶电泳图像

Fig. 2 Gel electrophoresis results of RT-PCR products

2.4 药敏试验 药敏试验结果 (表 1) 显示, 酒石酸泰乐菌素的最小抑菌浓度 (MIC) 最高, 为 0.122 μg/mL; 其次为延胡索酸泰妙菌素, 为 0.244 μg/mL; 磷酸替米考星为 3.906 μg/mL; 盐酸多西环素为 7.813 μg/mL; 盐酸林可霉素排在第 5 位, 其 MIC 为 15.625 μg/mL; 氟苯尼考 MIC 为 31.250 μg/mL, 盐酸环丙沙星和硫酸庆大霉素均为 62.500 μg/mL; 盐酸沙拉沙星最不敏感, 其 MIC 值为 125.000 μg/mL。

表 1 各种药物对 MS 的最小抑菌浓度 (MIC)

Table 1 The minimum inhibitory concentration (MIC) of various kinds of drugs on MS

序号 No.	药物 Drugs	MIC//μg/mL		
		重复 1 Repetition 1	重复 2 Repetition 2	重复 3 Repetition 3
1	延胡索酸泰妙菌素	0.244	0.244	0.244
2	磷酸替米考星	3.906	7.813	3.906
3	氟苯尼考	31.250	31.250	31.250
4	盐酸环丙沙星	62.500	62.500	62.500
5	盐酸多西环素	7.813	15.625	7.813
6	硫酸庆大霉素	62.500	62.500	62.500
7	盐酸林可霉素	15.625	15.625	15.625
8	盐酸沙拉沙星	125.000	125.000	250.000
9	酒石酸泰乐菌素	0.122	0.122	0.122

3 讨论

MS 是最重要的肉鸡致病性支原体之一。很多人认为 MS 感染是一种亚临床呼吸道感染^[8], 但越来越多报道表明 MS 可带来严重的呼吸道感染和关节鸡病, 给肉鸡养殖带来严重的经济损失^[9-11]。

该研究从张家口某鸡场疑似感染 MS 的肉鸡鼻孔、气管

和跗关节液中成功分离培养出 MS 菌落, 固体培养基上菌落小, 圆形, 光滑, 有致密中央隆起, 呈“煎蛋样”。结合养殖场肉鸡的临床症状, 鉴定为鸡 MS。这说明该鸡场存在 MS 感染, 结果准确可靠, 可进一步开展药敏试验, 对临床治疗能起到指导作用。

该研究采用的 PCR 检测方法可快速、灵敏准确地鉴别检测病原体, 给临床应用提供了极大的便捷和实用性^[12-13]。该研究采用 Lauerman 等^[14]的种特异性引物, 通过培养、血清学方面的比较, 灵敏度为 82%, 特异性达 100%。通过 PCR 方法确定该鸡场鸡群 MS 感染。

在临床治疗中应对治疗菌株进行药敏试验, 以选择有效的抗菌药物, 防止药物浪费, 节约治疗成本, 降低环境污染。该试验结果表明, 在延胡索酸泰妙菌素等 9 种抗生素中, 鸡 MS 临床分离株对酒石酸泰乐菌素的 MIC 为 0.122 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 延胡索酸泰妙菌素 MIC 为 0.244 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3 株分离株 MIC 差异不显著, 说明酒石酸泰乐菌素与延胡索酸泰妙菌素对该菌株抑制作用明显。盐酸环丙沙星、硫酸庆大霉素的 MIC 为 62.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 盐酸沙拉沙星的 MIC 为 125.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 抑菌效果不佳。该鸡场 MS 敏感药物为酒石酸泰乐菌素和延胡索酸泰妙菌素, 推荐使用这 2 种药物作为治疗首选药物。

参考文献

[1] 招雨婷, 覃健萍, 王占新, 等. 鸡滑液囊支原体的流行调查及不同地区分离株药物敏感性分析[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(6): 9-13.

[2] 雷元元, 郭亚男, 郭磊, 等. 一起禽滑液囊支原体病的诊断及垂直传播

验证[J/OL]. 中国动物传染病学报, 2019-10-23[2020-04-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2031.S.20191022.1705.004.html>.

[3] CARNAGHAN R B A. Egg transmission of infectious synovitis [J]. Journal of comparative pathology and therapeutics, 1961, 71(4): 279-285.

[4] TEBYANIAN H, MIRHOSSEINY S H, KHEIRKHAH B, et al. Isolation and identification of *Mycoplasma synoviae* from suspected ostriches by polymerase chain reaction, in Kerman Province, Iran [J]. Jundishapur journal of microbiology, 2014, 7(9): 1-5.

[5] 顾的乐. 鸡滑液囊支原体的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国新技术新产品, 2014(13): 165-166.

[6] 石晓磊, 齐田苗, 边海霞, 等. 宁夏地区鸡滑液囊支原体的分离鉴定与药敏试验[J]. 动物医学进展, 2018, 39(11): 134-136.

[7] 石晓磊. 鸡滑液囊支原体的分离鉴定及其活疫苗免疫效果的评价[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.

[8] VAN ECK J H, VAN KOL N, KOUWENHOVEN B. Egg production in relation to the results of a long term serological survey of 73 flocks of fowl [J]. Veterinary quarterly, 1980, 2(1): 15-24.

[9] 夏道伦, 黄晓苹. 鸡滑液囊支原体感染的流行及其防控措施[J]. 养禽与禽病防治, 2020(2): 43-46.

[10] 陈秀红, 郭亚男, 司朵朵, 等. 宁夏地区鸡滑液囊支原体病流行病学调查与分析[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42(3): 234-238.

[11] 郭亚男, 郭朋辉, 司朵朵, 等. 某蛋鸡养殖场鸡滑液囊支原体的分离鉴定及跗关节病理组织学观察[J]. 动物医学进展, 2020, 41(4): 48-52.

[12] POURBAKHS S A, SHOKRI G R, BANANI M, et al. Detection of *Mycoplasma synoviae* infection in broiler breeder farms of Tehran province using PCR and culture methods [J]. Archives of razi institute, 2010, 65(2): 75-81.

[13] HEIDENREICH A, BELLMUNT J, BOLLA M, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease [J]. European urology, 2011, 59(1): 61-71.

[14] LAUERMAN L H, HOERR F J, SHARPTON A R, et al. Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae* [J]. Avian diseases, 1993, 37(3): 829-834.

(上接第 69 页)

[32] 于方磊. 三种水生植物对苯的净化作用研究[D]. 太原: 山西大学, 2012.

[33] 王燕. 沉水植物对二种除草剂耐受性及二甲戊灵去除研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2018: 91.

[34] GARRISON A W, NZENGUNG V A, AVANTS J K, et al. Phytodegradation of p, p'-DDT and the Enantiomers of o, p'-DDT [J]. Environmental science & technology, 2000, 34(9): 1663-1670.

[35] 蔺庆伟. 杭州西湖西进水域沉水植物斑块镶嵌格局优化及稳定化研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2015: 99.

[36] 客涵. 南四湖沉水、浮叶植物群落结构与水环境因子相关研究[D]. 济南: 山东大学, 2014: 70.

[37] 赵凤斌. 异龙湖沉水植物群落恢复影响因子与恢复技术研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017: 130.

[38] 徐杰, 何萍, 王钦, 等. 夏季白洋淀沉水植物分布与水环境因子的关系[J]. 湿地科学, 2013, 11(4): 488-494.

[39] HILT S, ALIRANGUES NUÑEZ M M, BAKKER E S, et al. Response of submerged macrophyte communities to external and internal restoration measures in north temperate shallow lakes [J]. Frontiers in plant science, 2018, 9: 1-24.

[40] RODRIGO M A, ROJO C, ALONSO-GUILLÉN J L, et al. Restoration of two small Mediterranean lagoons: The dynamics of submerged macrophytes and factors that affect the success of revegetation [J]. Ecological engineering, 2013, 54: 1-15.

[41] SON D, CHO K H, LEE E J. The potential habitats of two submerged macrophytes, *Myriophyllum spicatum* and *Hydrilla verticillata* in the river ecosystems, South Korea [J]. Knowledge & management of aquatic ecosystems, 2017, 418: 1-11.

[42] HAVENS K E, SHARFSTEIN B, BRADY M A, et al. Recovery of submerged plants from high water stress in a large subtropical lake in Florida, USA [J]. Aquatic botany, 2004, 78(1): 67-82.

[43] 谭凯婷, 柳君侠, 王志红, 等. 沉水植物修复富营养化景观水体的研究进展[J]. 水处理技术, 2019, 45(6): 15-18, 27.

[44] 郭俊秀. 营养盐对沉水植物生长指标和抗氧化酶系统的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008: 60.

[45] 颜昌宙, 曾阿妍, 金相旭, 等. 不同浓度氨氮对轮叶黑藻的生理影响[J]. 生态学报, 2007, 27(3): 1050-1055.

[46] 纪庆亮. 三种水生植物氨氮耐受性和冬季净水效果研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2010: 71.

[47] 王斌, 李伟. 不同 N、P 浓度条件下竹叶眼子菜的生理反应[J]. 生态学报, 2002, 22(10): 1616-1621.

[48] 秦伯强, 张运林, 高光, 等. 湖泊生态恢复的关键因子分析[J]. 地理科学进展, 2014, 33(7): 918-924.

[49] ZHANG Y L, ZHANG B, MA R H, et al. Optically active substances and their contributions to the underwater light climate in Lake Taihu, a large shallow lake in China [J]. Fundamental and applied limnology/ Archiv für hydrobiologie, 2007, 170(1): 11-19.

[50] 苏胜齐, 姚维志. 沉水植物与环境关系评述[J]. 农业环境科学学报, 2002, 21(6): 570-573.

[51] 邱东茹, 吴振斌, 况琪军, 等. 不同生活型大型植物对浮游植物群落的影响[J]. 生态学杂志, 1998, 17(6): 22-27.

[52] 陈洪达. 养鱼对武汉东湖生态系的影响[J]. 水生生物学报, 1989, 13(4): 359-368.

[53] 吴振斌. 水生植物与水生态修复[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 418.

[54] WESTLAKE D F. Some effects of low-velocity currents on the metabolism of aquatic macrophytes [J]. J Exp Bot, 1967, 18(2): 187-205.