

鸡滑液囊支原体不同地区分离株对常用 抗菌药物的敏感性试验

丁美娟¹, 卢凤英¹, 严 鹏¹, 尹秀凤¹, 张小飞^{1,2*}

(1. 南京天邦生物科技有限公司, 南京 211102; 2. 江苏省农业科学院兽医研究所, 南京 210014)

[收稿日期] 2015-07-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2015) 10-0052-04 [中图分类号] S852.62

[摘 要] 为调查不同地区鸡滑液囊支原体的耐药情况, 从河南、江苏、安徽、河北和广东五省 204 份疑似鸡滑液囊支原体感染鸡的病料中分离到 20 株鸡滑液囊支原体, 每省随机取 1 株进行了 12 种常用抗菌药物的敏感性测定。结果表明, 5 株鸡滑液囊支原体均对泰乐菌素较为敏感, 而对恩诺沙星、氧氟沙星、盐酸环丙沙星具有不同程度的耐受性。本实验可为临床合理用药提供参考。

[关键词] 鸡滑液囊支原体; 分离鉴定; 药物敏感性试验

Sensitivity Test of *Mycoplasma synoviae* Isolates from Different Geographical Locations to Common Antimicrobial Drugs

DING Mei-juan¹, LU Feng-ying¹, YAN Peng¹, YIN Xiu-feng¹, ZHANG Xiao-fei^{1,2*}

(1. Nanjing Tianbang Bio-Industry Co. Ltd, Nanjing 211102, China;

2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to investigate the drug resistance of *Mycoplasma synoviae*, 20 isolates out of 204 pathologic materials of suspected *Mycoplasma synoviae* infection in chickens from Henan, Jiangsu, Anhui, Hebei and Guangdong were examined and identified, and the sensitivities of 5 isolates (from 5 different provinces) to 12 common antimicrobial drugs were tested. The results demonstrated that all of the 5 *Mycoplasma synoviae* isolates were more sensitive to tylosin, and had different degrees of tolerances to enrofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin hydrochloride. This paper can provide reference for rational usage of antibiotics in clinic.

Key words: *Mycoplasma synoviae*; isolation and identification; drug sensitivity test

滑液囊支原体 (*Mycoplasma synoviae*, MS) 可引致鸡和火鸡的传染性滑液囊炎, 可通过卵传递^[1]。由于该病主要涉及关节的滑液囊及腱鞘, 引起滑膜炎、腱鞘炎, 一旦在鸡群中感染很难根除。该病在鸡群中长期蔓延, 会导致饲料利用率低、生长发育

迟缓、淘汰率增高、产蛋量下降等^[2]。发病鸡群抵抗力下降, 易发生与其他病原体的混合感染, 加剧病情, 增加死亡率, 造成严重的经济损失。鸡滑液囊支原体病的控制主要是通过疫苗免疫和药物控制^[3]两种方法, 到目前为止, 仅澳大利亚等国家有

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目 CX(14)2131

作者简介: 丁美娟, 助理研究员, 从事动物传染病预防研究。

通讯作者: 张小飞。E-mail: xiaofei0804@sina.com

商品化的 MS 灭活疫苗和弱毒疫苗应用^[4], 而我国养殖场主要靠抗菌药物控制该病, 但药物防治效果不佳的情况越来越明显。本试验旨在调查各常规抗菌药物对鸡滑液囊支原体的耐药性, 为鸡滑液囊支原体病临床合理用药提供指导。

1 材料

1.1 鸡滑液囊支原体菌株及临床病料的采集 标准株 MS GX11 - T 株(批号: 20060701), 购自中国兽医药品监察所; 对 2012 - 2014 年从河南、江苏、安徽、河北和广东五省送检的 204 份疑似鸡滑液囊支原体感染的病鸡, 无菌采集其肿胀关节腔内容物。

1.2 培养基 改良 Frey 氏液体培养基, 南京天邦生物科技有限公司生物技术研究提供。

1.3 主要试剂 MS 阳性血清(批号: 200501)、MG 阳性血清(批号: 200701)和标准阴性血清(批号: 20071217), 购自中国兽医药品监察所; Taq 酶, 购自大连宝生物工程公司。

1.4 抗菌药物 泰乐菌素(批号: 1311140109), 大连三仪动物药业有限公司; 红霉素(批号: 20130409)、氟苯尼考(批号: 20130826), 南京福斯特牧业科技有限公司生产; 替米考星(批号: 201405011)、氧氟沙星(批号: 201401003), 保定冀中药业有限公司生产; 林可霉素(批号: 20140103), 江苏恒丰强生物技术有限公司; 盐酸土霉素(批号: 20140218), 广东大华农动物保健品股份公司; 庆大霉素(批号: 20140210), 天津嘉创生物科技有限公司; 卡那霉素(批号: C9U131204), 河北远征药业有限公司; 环丙沙星(批号: 20130102), 洛阳惠中兽药有限公司; 恩诺沙星(批号: 20131101), 佛山市南海东方澳龙制药有限公司; 金霉素(批号: 1013042006), 齐鲁制药(内蒙古)有限公司。

2 方法

2.1 分离培养及形态观察 对采集样品进行支原体分离培养, 置 37 °C 温箱培养, 待培养液变为黄色时, 接种到新的培养液中传代, 取培养物涂片, 瑞氏染色, 油镜下观察菌体形态; 另取传 3 代后的液体培养物 100 μ L 接种于改良 Frey 氏固体培养基上培养, 如果固体培养基上有菌落生长, 置低倍显微镜下观察中央凸起呈荷包蛋样的菌落, 进一步做血清鉴定。

2.2 鸡红细胞吸附试验 取 5 mL 0.25% 鸡红细胞悬液加入已培养好的固体培养基表面, 在室温下作用 20 min, 弃去红细胞悬液, 用生理盐水洗涤 3 次, 在低倍显微镜下观察, 看菌落表面有无红细胞吸附。

2.3 血清学试验 液体培养物 37 °C 培养 3 代后, 参照姜平^[5]介绍的方法, 离心浓缩进行平板凝集试验。

2.4 代谢抑制试验 在廖永洪等^[6]方法的基础上改进。在 10 支小管中分别加入 1 mL 改良 Frey 氏液体培养基, 于第 1 支小管内加入 1 mL 抗鸡滑液囊支原体特异性血清, 混匀后取 1 mL 于第 2 支小管, 如此进行 2 倍梯度稀释至第 8 支小管, 混匀后弃去 1 mL。取对数生长期分离株培养物, 用改良 Frey 氏液体培养基 10000 倍稀释, 在第 1 ~ 9 支小管内分别加入 1 mL 稀释培养物, 第 10 支管内加入 1 mL 抗鸡滑液囊支原体特异性血清, 置 37 °C 培养。每天观察培养液的颜色变化, 当菌液对照管颜色变黄时, 小管中培养液颜色未变黄的血清最高稀释度的倒数即为抑制价。取标准阴性鸡血清, 按以上程序进行操作, 作为代谢抑制试验的对照。

2.5 PCR 扩增及测序 根据鸡滑液囊支原体 *vlaA* 基因设计合成一对引物, 预期扩增片段大小为 1050 bp 左右, 上游引物 MS1: 5' - CCTACGGGAGGCAGCAGT - 3', 下游引物 MS2: 5' - AGGCAGTCGTGTCCCAAGGTC - 3'。按热裂解法^[7]提取模板 DNA, 进行 PCR 扩增。

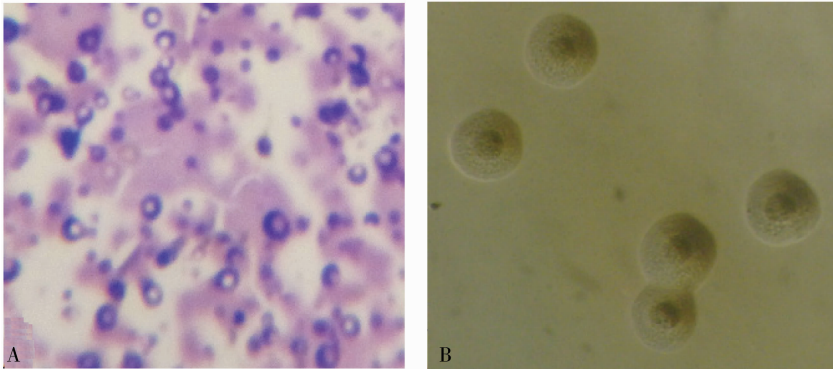
2.6 抗菌药物稀释 分别称取各种抗菌药物溶于适宜稀释液中, 无菌操作配制成浓度为 110 μ g/mL 的原液, 于 4 °C 保存备用。

2.7 最低抑菌浓度(MIC)的测定 从河南、江苏、安徽、河北和广东 5 省分离鉴定的 20 株 MS, 每省随机选取 1 株进行 MIC 测定。MIC 的测定方法参照吴清民等^[8]并改进。根据不同分离株的颜色变化单位(CCU)以决定接种菌液量(10^4 CCU/mL)。MIC 测定: 在灭菌试管中分别加入改良 Frey 氏液体培养基 2 mL, 14 管/组, 于每组的第 1 管依次分别加入上述稀释并除菌的抗生素各 0.5 mL, 然后按 5 倍倍比稀释至第 11 管后弃去多余的 0.5 mL, 接着各孔加入 200 μ L 待测菌液(10^4 CCU/mL)。第 12 管作为阴性对照(培养基 2 mL), 第 13 管作为药物对照(培养基 2 mL + 抗生素 0.5 mL), 第 14 管(培养基 2 mL + 200 μ L 待测菌液)不加抗生素作阳性对照。加塞后, 置 37 °C 含 5% CO₂ 培养箱内培养。判定结果: 当阴性对照孔不变色, 阳性对照变为黄色, 以试验孔不发生颜色变化(即没有 MS 生长)的最小抗生素浓度孔的稀释度为该药物对被试菌株的 MIC。

3 结果

3.1 鸡滑液囊支原体的分离鉴定

3.1.1 鸡滑液囊支原体的分离 对从河南、江苏、安徽、河北和广东五省采集的 204 份样品进行支原体的分离培养,共分离到 20 株鸡滑液囊支原体。分离菌经瑞氏染色,在油镜下呈球形或椭圆形,菌落在



A:分离菌的瑞氏染色(10×100);B:分离菌在固体培养基上的菌落形态(10×10)

图 1 分离菌的形态观察

表 1 五省鸡滑液囊支原体的分离情况			
来源	采样数	分离菌株数	分离率/%
河南	40	4	10
江苏	44	4	9.09
安徽	42	4	9.52
河北	35	3	8.57
广东	43	5	11.63
总计	204	20	9.8

3.1.2 鸡红细胞吸附试验 分离菌与鸡红细胞液作用一段时间后,在低倍显微镜下可见菌落表面吸附红细胞。

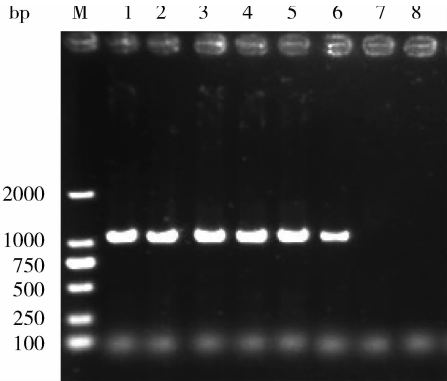
3.1.3 血清学试验 液体培养物 37℃ 培养 3 代后离心浓缩,平板凝集试验结果显示,分离菌能够与 MS 标准阳性血清呈凝集反应,而与 MG 标准阳性血清不产生凝集反应。

3.1.4 代谢抑制试验 培养至第 3 天时,菌液对照管及代谢抑制试验对照管的培养液均变为黄色,血清对照管培养液颜色无变化,加有抗血清的第 7~8 支小管内的培养液变为黄色,即其代谢抑制价为 128。

3.1.5 PCR 扩增及测序 根据鸡滑液囊支原体 *vlhA* 基因进行扩增(图 2)和测序,并将测序结果与 GenBank MS *vlhA* 序列比对,同源性的 98.63%。

3.2 不同地区临床分离鸡滑液囊支原体对常用抗菌药物敏感性试验

固体培养基上表现为细小、光滑、致密的小菌落,半凹陷于培养基内,在低倍镜下观察到菌落形态为特征性的“煎蛋状”(图 1),5 省的分离情况见表 1。



M. DL2000 DNA Marker;1-5:分离株;
6:MS GX11-T 株;7:MG CR 株;8:阴性对照

图 2 鸡滑液囊支原体 *vlhA* 基因 PCR 产物的凝胶电泳图

3.2.1 MIC 的测定 泰乐菌素等 12 种抗生素对鸡滑液囊支原体标准株(MS GX11-T)及鸡滑液囊支原体临床分离株的 MIC 测定结果见表 2。结果显示,鸡滑液囊支原体标准株和 5 株临床分离株均对泰乐菌素比较敏感,MIC 值为 0.035 μg/mL;替米考星、林可霉素、氟苯尼考、盐酸土霉素和庆大霉素敏感性次之,MIC 值介于 0.035~0.176 μg/mL;金霉素、红霉素、卡那霉素敏感性显著下降,MIC 值介于 0.176~0.88 μg/mL;恩诺沙星、氧氟沙星、盐酸环丙沙星敏感性较差,MIC 值介于 0.88~4.4 μg/mL。

表 2 泰乐菌素等 12 种抗菌药物对鸡滑液囊支原体的 MIC 值 μg/mL

抗菌药物	MS GX11 - T	河南株	江苏株	安徽株	河北株	广东株
盐酸环丙沙星	4.4	4.4	0.88	0.88	4.4	4.4
泰乐菌素	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035
氟苯尼考	0.176	0.035	0.176	0.176	0.035	0.176
恩诺沙星	0.88	4.4	0.88	0.88	4.4	4.4
林可霉素	0.035	0.035	0.176	0.176	0.035	0.035
氧氟沙星	4.4	0.88	4.4	4.4	4.4	4.4
替米考星	0.176	0.035	0.035	0.035	0.176	0.176
盐酸土霉素	0.176	0.035	0.035	0.035	0.176	0.035
庆大霉素	0.176	0.176	0.035	0.035	0.176	0.176
卡那霉素	0.176	0.176	0.88	0.88	0.88	0.176
金霉素	0.88	0.176	0.88	0.88	0.176	0.88
红霉素	0.88	0.88	0.176	0.176	0.88	0.88

4 讨 论

本研究从河南、江苏、安徽、河北和广东 5 省肉种鸡场疑似鸡滑液囊支原体感染的病鸡跗关节样品进行病原菌的分离与鉴定,分离菌经瑞氏染色在油镜下呈球形或椭圆形,在固体培养基上表现为细小、光滑、致密的小菌落,菌落形态为"煎蛋状",结合进一步的代谢抑制试验可确诊为鸡滑液囊支原体,与徐静等^[9]结论相符合。虽然支原体的分离鉴定操作难度较大,费时费力,但结果可靠准确,并且能进一步进行药敏试验,对临床用药具有指导作用。

从本试验结果看,在泰乐菌素等 12 种抗生素中,鸡滑液囊支原体标准株及 5 株鸡滑液囊支原体临床分离菌株对泰乐菌素的 MIC 值均为 0.035 μg/mL,刘秋秋等^[10]对 MS GX11 - T 株测定的 MIC 值为 0.031 μg/mL,两者测定的 MIC 值差异不大,说明不同地区鸡滑液囊支原体对泰乐菌素仍然保持较好的敏感性,与 Landman 等^[11]体外研究发现 17 种 MS 荷兰本地分离株以及典型株 WVU1853 均对泰乐菌素敏感的结果一致,分析可能是因为泰乐菌素价格较贵,成本高,临床使用不多,所以才没有造成鸡滑液囊支原体对其产生耐药性。宋战胜^[12]、曹中赞^[13]等认为不同菌株对药物的敏感性存在差异;本研究中江苏株和安徽株对林可霉素最低抑菌浓度为 0.176 μg/mL,而标准株 MS GX11 - T 及其余 3 株鸡滑液囊支原体临床分离株对林可霉素最低抑菌浓度为 0.035 μg/mL,此试验也证实了这一点。因此,临床应定期对不同地区流行株进行药敏试验,选用有效的抗菌药物,以减少耐药性的产生和扩散。

参考文献:

[1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 第 5 版. 北京: 中国农业出版社, 2012: 237 - 238.

[2] 丁美娟, 尹秀凤, 黄显明, 等. 鸡滑液囊支原体病研究进展[J]. 中国家禽, 2013, 35(13): 39 - 41.

[3] 宁宜宝. 动物支原体病预防与控制的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 1999, 33(1): 45 - 48.

[4] Feberwee A, Morrow C J, Ghorashi S A, *et al.* Effect of alive *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of egg - shell apex abnormalities induced by a *M. synoviae* infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D1466[J]. *Avian Pathol*, 2009, 38(5): 333 - 340.

[5] 姜 平. 兽医生物制品学[M]. 第 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 307.

[6] 廖永洪, 张许科, 孙进忠, 等. 一株猪肺炎支原体 HN0613 株的分离鉴定[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(3): 4 - 6.

[7] 牛建强, 王希东, 党荣理, 等. 鸡源霉形体 PCR 检测方法的研究[J]. 新疆农业大学学报, 2003, 26(4): 76 - 77.

[8] 吴清民, 杨秀玉, 沈志强, 等. 鸡毒支原体的分离鉴定和最低抑菌浓度测定[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(4): 309 - 312.

[9] 徐 静, 邱文英, 方鹏飞, 等. 支原体 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(11): 17 - 21.

[10] 刘秋秋, 薛青红, 张 媛, 等. 恩诺沙星及其他抗菌药对鸡滑液囊支原体的体外联合抑菌试验[J]. 中国家禽, 2013, 35(22): 13 - 16.

[11] Landman W J, Mevius D J, Veldman K T, *et al.* *In vitro* antibiotic susceptibility of Dutch *Mycoplasma synoviae* field isolates originating from joint lesions and the respiratory tract of commercial poultry [J]. *Avian Pathol*, 2008, 37(4): 415 - 420.

[12] 宋战胜. 鸡滑液囊支原体病发病情况调查及诊治[J]. 中国家禽, 2009, 31(12): 51 - 52.

[13] 曹中赞, 栾新红, 刘胜旺, 等. 禽滑液囊支原体研究进展[J]. 动物医学进展, 2012, 33(11): 113 - 117.