

薛琛璐, 张艳, 刘海隆, 等. 鸡毒支原体和鸡滑液囊支原体的双重 PCR 检测方法建立及其在海南文昌鸡主养区感染情况调查 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (8): 100-107.

XUE C L, ZHANG Y, LIU H L, et al. Establishment of duplex PCR method for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* and etiology investigation of Wenchang chicken breeding areas in Hainan Province [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (8): 100-107.

鸡毒支原体和鸡滑液囊支原体的双重 PCR 检测方法建立及其在海南文昌鸡主养区感染情况调查

薛琛璐¹, 张艳^{1*}, 刘海隆¹, 陈素贞¹, 董亚童², 晁哲¹, 魏立民¹, 刘圈炜¹

(1. 海南省农业科学院畜牧兽医研究所/海南省热带动物繁育与疫病研究重点实验室/夏威夷院士团队创新中心, 海南海口 571100;

2. 新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要: 旨在建立快速精准检测鸡毒支原体 (MG) 和鸡滑液囊支原体 (MS) 的双重 PCR 方法, 并利用该方法检测分析海南文昌鸡主要养殖地区 MG 和 MS 感染现状及流行特点。针对 MG *mgC2* 基因和 MS *vlhA* 基因的保守序列, 分别设计引物并合成, 通过对反应条件及程序的优化, 建立 MG、MS 双重 PCR 检测方法; 对所建方法进行灵敏性、特异性及重复性验证, 同时与国家农业行业标准进行比较, 验证其准确性。应用所建方法对海南文昌鸡主要养殖地区采集的 1 510 份未免疫 MG、MS 疫苗的文昌鸡咽喉拭子进行病原学检测。结果显示: 建立的双重 PCR 检测方法对 MG、MS 的最低检测限度均达到 2.1×10^2 拷贝/ μ L; 与新城疫、马立克氏病、传染性法氏囊病和传染性喉气管炎等 4 种鸡常见病的病原不发生交叉反应; 与国家农业行业标准发布的 MG、MS 单一 PCR 方法检测结果的符合率分别达到 100% 与 98.83%; 病原学检测结果显示, 海南文昌鸡主要养殖地区 MG 的感染率为 11.79% (95% CI: 10.16%~13.42%), MS 的感染率为 25.96% (95% CI: 23.75%~28.17%), MG 和 MS 的混合感染率为 7.42% (95% CI: 6.10%~8.74%); MG 和 MS 在春季高发, 以中型规模养殖场和成年鸡感染情况最为严重, 商品代肉鸡的阳性率最高。结果表明, 本研究建立的 MG、MS 双重 PCR 检测方法具有良好的敏感性、特异性、稳定性和准确性, 可应用于临床样本的检测; 当前海南省文昌鸡主要养殖地区存在 MG、MS 感染, 应加强防控。

关键词: 鸡毒支原体; 鸡滑液囊支原体; 双重 PCR; 病原学; 文昌鸡

中图分类号: S852.62 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)08-0100-08

Establishment of duplex PCR method for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* and etiology investigation of Wenchang chicken breeding areas in Hainan Province

XUE Chenlu¹, ZHANG Yan^{1*}, LIU Hailong¹, CHEN Suzhen¹, DONG Yatong²,

CHAO Zhe¹, WEI Limin¹, LIU Quanwei¹

(1. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine of Hainan Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Tropical Animal Breeding and Disease Research/Xia Xianzhu Academician Team

Innovation Center, Haikou 571100, China;

2. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: This study was to establish a duplex PCR method for detection of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synovium* (MS) so as to clarify the infection status and epidemic characteristics of MG and MS in the main Wenchang chicken breeding areas in Hainan Province. According to the conserved sequences of the MG *mgC2* gene and the MS *vlhA* gene, primers were respectively designed. The duplex PCR method for detection of MG and MS was established by optimizing the reaction conditions and procedures. And the sensitivity, specificity and repeatability of the method were verified. At the same time, the established method was compared with the national agricultural industry

收稿日期: 2024-10-29; 修回日期: 2025-06-09

基金项目: 海南省农业科学院畜牧兽医研究所级重点任务项目 (HNXM2024ZD01); 农业农村部优势特色产业集群 (文昌鸡) 项目 (WC-SCICP20211106); 国家现代农业肉鸡产业技术体系专项 (CARS-41-Z12)

第一作者: 薛琛璐, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 张艳, 博士, 研究员, 主要从事动物疫病防治研究, E-mail: zy79818_0@163.com。

standard method to verify its accuracy. Finally, 1 510 throat swab samples collected from the main Wenchang chicken breeding areas in Hainan Province were detected with this method. The results showed that the minimum detection limit of the duplex PCR method for detecting MG and MS positive plasmids was 2.1×10^2 copies/ μL . There was no cross reaction with Newcastle disease, Marek's disease, Infectious bursal disease and Infectious Laryngotracheitis. Compared with the MG and MS single PCR, the positive coincidence rates of the two methods were 100% and 98.83%, respectively. The results of the pathogenic detection showed that the infection rate of MG was 11.79% (95% CI: 10.16%–13.42%), that of MS was 25.96% (95% CI: 23.75%–28.17%), and the mixed infection rate of MG and MS was 7.42% (95% CI: 6.10%–8.74%). MG and MS had a high incidence in spring, most seriously in medium-sized farms, adult chickens and commercial broilers. The present results indicated that the duplex PCR method of MG and MS established in this study had good sensitivity, specificity, stability and accuracy, and could be used in clinical detection. Currently, there are infections of MG and MS in Wenchang chicken breeding areas of Hainan Province, so the prevention and control of MG and MS should be strengthened.

Keywords: *Mycoplasma gallisepticum*; *Mycoplasma synoviae*; Duplex PCR; etiology; Wenchang chicken

自1936年禽支原体病被定义为鸡的呼吸道疾病之后,便一直威胁着养鸡业的健康发展,给养鸡业带来了巨大的困扰和经济损失^[1]。至今发现的与禽类相关的支原体有20余种,其中,鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*, MG)和鸡滑液囊支原体(*Mycoplasma synoviae*, MS)是禽支原体中流传范围最广且致病力最强的两类支原体。MG感染后主要引起鸡和火鸡以及其他家禽的慢性呼吸道疾病^[2],患病鸡会表现出不同程度的呼吸道症状,如呼吸不畅、气喘等,严重时可见鼻腔内出现大量分泌物,病禽食欲废绝,最终死亡^[3];感染MS的鸡会出现脚垫、关节肿大、跛行、瘫痪、胸部皮下积液肿胀等症状,有时会出现呼吸道症状,蛋壳尖端异常、鸡的生长性能和产蛋量下降等现象^[4]。

近年来, MG和MS在我国呈现出逐年增长趋势,许多省份都出现了MG和MS感染,且二者混合感染的病例也越来越多^[5-6]。研究表明,严格做好生物防控,定期监测鸡群MG和MS情况,淘汰阳性鸡,可大大提升MG和MS的防控效果^[7]。

然而,对于MG和MS的监测而言,目前临床上的检测手段精准度不够、操作复杂、检测成本高或是检测所需的仪器缺乏。如病原分离鉴定,虽然是检测支原体的金标准,但其操作难度大、时间长,可能需要3~4周;血清学检测速度快,成本低,但易出现非特异性和交叉反应,无法区分疫苗毒与野毒,并且不能同时检测MG和MS,缺点较多;荧光定量PCR检测技术敏感性高,但检测成本较高,且受检测仪器的限制,在基层实验室应用不多^[8-9]。而相较于这些方法,PCR方法则更加快速、灵敏和廉价,适用于临床大规模检测或监测^[10]。多重PCR检测方法是在普通PCR方法的基础上发展起来的,可实现一个样本一次可检测多种疾病,具有节省时间、人力和物力的优点,适用于大量临床样本(特别是混合感染样品)中病原体的快速诊断。目前临床上已有一些MG和MS的多重PCR检测方法^[11-13],但这些方法要么

敏感性不高,要么在检测样品中会有非特异性条带出现。因此,本研究通过对MG *mgC2* 基因和MS *vlhA* 基因的保守序列进行引物设计,并对其反应体系和条件进行优化,建立起敏感性高、特异性强、经济适用的MG和MS双重PCR检测方法,为检测防控MG、MS提供可靠的技术手段;同时应用所建方法对海南省文昌鸡主要养殖地区采集的1 510份文昌鸡咽喉拭子进行病原学检测,以掌握MG、MS在海南省文昌鸡主要养殖地区的流行情况,为科学有效防控MG和MS提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 菌(毒)株和疫苗

MG、MS均保存于海南省农业科学院畜牧兽医研究所实验室,新城疫(Newcastle disease, ND)活疫苗(La Sota株),马立克氏病(Marek's disease, MD)火鸡疱疹病毒活疫苗(FC-126株),传染性法氏囊病(infectious bursal disease, IBD)活疫苗(B87株),传染性喉气管炎(infectious laryngotracheitis, ILT)活疫苗(K317株),均购自哈药集团生物疫苗有限公司;鸡支原体(*Mycoplasma gallinarum*, *M. gallinarum*)(ATCC 15319株)和模仿支原体(*Mycoplasma imitans*, *M. imitans*)(4 229株)DNA由西北农林科技大学兽医免疫学实验室馈赠。

1.2 样品来源

分别于海南省文昌鸡主要养殖地区(海口、文昌、琼海、儋州)的11个不同规模、不同饲养类型的文昌鸡场,采用随机抽样的方式,在不同季节采集不同类型、不同生长阶段的未免疫MG、MS疫苗的文昌鸡咽喉拭子共1 510份,于-80℃冰箱保存。

1.3 主要试剂

2×*Taq* Plus Master Mix (Dye Plus)、DNA/RNA Extraction Kit均购自南京诺唯赞生物科技有限公司;DL500 DNA Marker、pMD™18-T Vector Cloning Kit、大肠杆菌DH5α感受态细胞、50×TAE缓冲液,均购

自宝生物工程（大连）有限公司；DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒均、FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix，购自天根生化科技（北京）有限公司；琼脂糖 Agarose 购自生工生物工程（上海）股份有限公司。

表 1 采样鸡场信息

编号	养殖类型	采样数量/份	地点
1	种鸡场 1	264	文昌
2	种鸡场 2	244	海口
3	种鸡场 3	184	海口
4	种鸡场 4	196	海口
5	种鸡场 5	260	文昌
6	商品蛋鸡场 1	32	海口
7	商品蛋鸡场 2	30	海口
8	商品肉鸡场 1	96	海口
9	商品肉鸡场 2	60	文昌
10	商品肉鸡场 3	44	琼海
11	商品肉鸡场 4	100	儋州

1.4 试验方法

1.4.1 引物的设计与合成

根据 GenBank 中公布的 MG *mgC2* 基因和 MS *vlhA* 基因序列，运用 MegAlign 软件对其序列进行对比后选取保守区域，利用 Oligo 7 软件进行引物设计，引物序列见表 2。引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

表 2 MG、MS 引物序列

名称	引物序列 (5'→3')	片段大小/bp
MG-F	TTCTTTACTCTTGGCTTTAGGG	119
MG-R	GTCTTCGATTATCCAAAGGGA	
MS-F	ACCCTGTAGAGACTGCTAAAAC	196
MS-R	TTAGCAGCAGTAACCGATCC	

1.4.2 核酸提取及 cDNA 合成

ND、MD、IBD、ILT 活疫苗用无菌 PBS 缓冲液稀释后，取稀释液；采集的咽喉拭子加入生理盐水浸泡挤压后，4 ℃ 离心取上清液。将获得的稀释液与上清液参照核酸提取说明书进行核酸提取，获得 MS、MG、马立克氏病病毒（MDV）、传染性喉气管炎病毒（ILT）及临床样品的 DNA 于 -20 ℃ 冰箱保存备用，新城疫病毒（NDV）和传染性法氏囊病病毒（IBDV）的 RNA 测定浓度后反转录成 cDNA 于 -20 ℃ 冰箱保存备用。

1.4.3 阳性质粒标准品的制备

以 MG、MS 的 DNA 为模板，进行 PCR 扩增。扩增产物经 2% 浓度琼脂糖凝胶电泳检测后，切下目的片段凝胶，纯化回收后与 pMD18-T 载体连接，连接产物转化至感受态细胞 DH5 α 中。挑取单菌落进行菌液扩增验证，验证成功后送生工生物工程（上海）股份有限公司测序。测序结果无误的菌液提取质粒，经浓度测定后于 -20 ℃ 冰箱保存备用。

1.4.4 单重 PCR 反应体系的建立及优化

以 MG 和 MS 的阳性质粒为模板，建立 25 μ L 单重 PCR 扩增反应体系：上游引物（10 μ mol/L）1 μ L，下游引物（10 μ mol/L）1 μ L，DNA 模板 1 μ L，2 \times Taq Plus Master Mix（Dye Plus）12.5 μ L，双蒸水补齐至 25 μ L。先根据引物的解链温度，将退火温度的优化范围设定在 53~60 ℃，共设 8 个梯度；确定最适温度后，选择 28、32 和 35 个循环进行优化。

1.4.5 双重 PCR 反应体系的建立及优化

以 MG、MS 的阳性质粒等体积混合物为模板，建立 25 μ L 反应体系。基于单重 PCR 优化结果，对 MG、MS 双重 PCR 反应体系进行优化。将退火温度分别设置为 50、51.2、52、53.1、54、55.2、56.5 和 57 ℃。循环次数分别为 28、32 和 35 个循环。上下游引物（10 μ mol/L）添加量分别为 0.4、0.5、0.6、0.8 和 1 μ L。经 PCR 反应验证确定最佳退火温度、循环数和引物添加量后，建立起 MG、MS 双重 PCR 检测方法。

1.4.6 双重 PCR 敏感性试验

将 MG 和 MS 的阳性质粒等体积混匀后进行 10 倍梯度稀释，以 10⁹~10⁰ 拷贝/ μ L 共 10 个浓度梯度为模板，根据优化所得条件进行扩增，以此确定所建方法的敏感性。

1.4.7 双重 PCR 特异性试验

以 MG、MS、MDV、ILT、NDV、IBDV、*M. gallinarum* 和 *M. imitans* 的 DNA/cDNA 为模板，用所建方法对其进行扩增，以此确定建立方法的特异性。

1.4.8 双重 PCR 重复性试验

选择拷贝数在 10⁶ 拷贝/ μ L 的 MG 和 MS 阳性质粒，混匀后取 1 μ L 作为模板，用优化后的反应条件进行扩增，重复 3 次，以确定所建方法的批内重复性。选择同浓度混匀后的质粒，在不同时间进行 PCR 扩增，以此确定所建方法的批间重复性。

1.4.9 临床应用

随机选取 256 份临床样品，同时应用本研究建立的 MG、MS 双重 PCR 检测法与中华人民共和国农业行业标准发布的 MG、MS 单一 PCR 检测法^[14]进行样

品检测,将检测结果进行比对,以此验证所建方法的准确性。

应用本研究建立的 MG、MS 双重 PCR 检测法对采集的 1 510 份咽喉拭子进行病原学检测。通过凝胶电泳判定检测结果,在 119 bp 处出现条带判定为 MG 阳性,在 196 bp 处出现条带判定为 MS 阳性,同时出现条带判定为 MG、MS 混合感染。

1.5 数据统计与分析

所有试验数据由 Excel 2019 软件进行汇总。使用 SPSS 26.0 软件对 MG、MS 阳性率进行卡方检验。各组间 MG、MS 阳性率差异性采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行分析。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 阳性质粒构建

结果显示(图1),构建的 MG、MS 阳性质粒分别在 119 和 196 bp 处扩增出目的条带,与预期结果相符;其浓度经紫外分光光度计测定后均为 $67 \text{ ng}/\mu\text{L}$,换算拷贝数为 2.1×10^{10} 拷贝/ μL 。

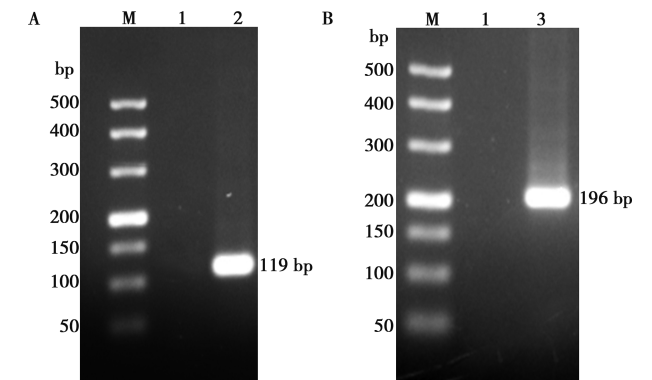


图1 MG (A)、MS (B) 阳性质粒验证结果

2.2 单重 PCR 反应体系的建立

经优化, MG 单重 PCR 的最适反应条件为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $54 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, 循环 35 次; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min。MS 单重 PCR 的最适反应条件为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $53 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, 循环 32 次; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min。

2.3 双重 PCR 反应体系的建立

MG、MS 双重 PCR 反应体系优化结果表明, MG、MS 双重 PCR 的最优反应体系为: MG 上游引物 ($10 \text{ } \mu\text{mol}/\text{L}$) $1 \text{ } \mu\text{L}$, MG 下游引物 ($10 \text{ } \mu\text{mol}/\text{L}$) $1 \text{ } \mu\text{L}$, MS 上游引物 ($10 \text{ } \mu\text{mol}/\text{L}$) $0.6 \text{ } \mu\text{L}$, MS 下游

引物 ($10 \text{ } \mu\text{mol}/\text{L}$) $0.6 \text{ } \mu\text{L}$, DNA 模板 $1 \text{ } \mu\text{L}$, $2 \times \text{Taq Plus Master Mix (Dye Plus)}$ $12.5 \text{ } \mu\text{L}$, 双蒸水补齐至 $25 \text{ } \mu\text{L}$ 。最优反应条件为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $51.2 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, 循环 35 次; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min。

2.4 双重 PCR 敏感性试验

敏感性试验结果如图 2 所示,建立的双重 PCR 检测方法对 MG 和 MS 的最低检测限为 2.1×10^2 拷贝/ μL 。

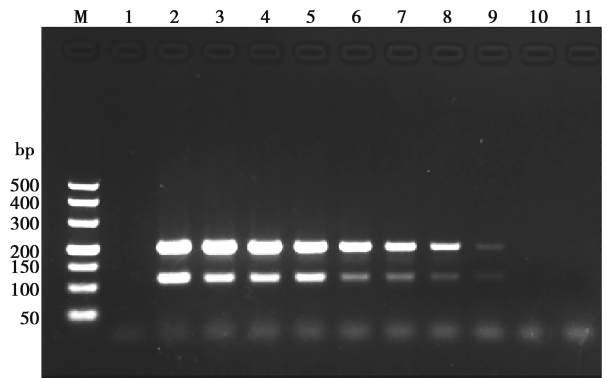


图2 MG、MS 双重 PCR 敏感性验证结果

2.5 双重 PCR 特异性试验

特异性试验结果见图 3,只有 MG 和 MS 的模板扩增出现单一目的条带, ILTV、IBDV、NDV、MDV、*M. gallinarum*、*M. imitans* 的模板均未扩增出条带,说明所建方法特异性良好。

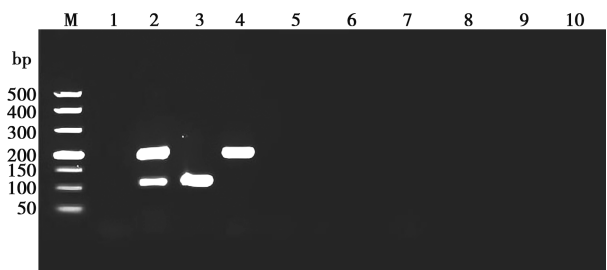


图3 MG、MS 双重 PCR 特异性验证结果

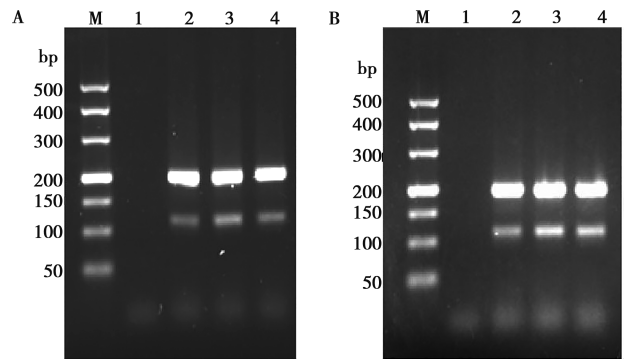
2.6 双重 PCR 重复性试验

重复性试验结果见图 4,批内重复和批间重复均出现清晰的目的条带,说明所建方法重复性良好。

2.7 双重 PCR 准确性试验

临床检测结果见表 3,使用国家农业行业标准检

测法检出 MG 阳性样品 4 份, 阳性率为 1.2% (4/256), 检出 MS 阳性样品 13 份, 阳性率为 5.08% (13/256), 检出 MG/MS 双阳性样品 3 份, 阳性率为 1.17% (3/256); 采用本试验建立的方法检测, 检出 MG 阳性样品 4 份, 阳性率为 1.2% (4/256), 检出 MS 阳性样品 16 份, 阳性率为 6.25% (16/256), 检出 MG/MS 双阳性样品 3 份, 阳性率为 1.17% (3/256)。经比较, 两种方法检测 MG 的符合率为 100% (256/256), 检测 MS 的符合率为 98.83% (253/256), 且本试验所建 MG、MS 双重 PCR 检测方法的 MS 阳性检出率高于国家农业行业标准检测法。



M. DL500 Marker; 1. 阴性对照; 2~4. 阳性质粒。
A. 批内重复; B. 批间重复。

图 4 MG、MS 双重 PCR 重复性验证结果

表 3 双重 PCR 检测方法与行业标准 PCR 检测方法的符合率

检测病原	样品数/份	双重 PCR 检测法		行业标准检测法		检测结果一致的 样品数/份	符合率/%
		阳性样品数/份	阴性样品数/份	阳性样品数/份	阴性样品数/份		
MG	256	4	252	4	252	256	100
MS	256	16	240	13	243	253	98.83

2.8 文昌鸡咽喉拭子样品的 MG、MS 病原检测

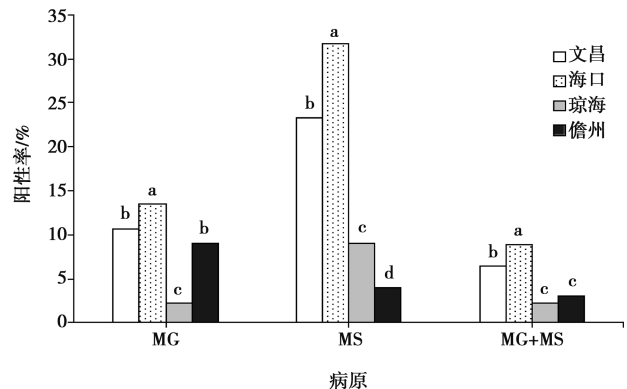
2.8.1 不同地区文昌鸡 MG、MS 病原检测

本次采集的 1 510 份文昌鸡咽喉拭子样品中, 检出 MG 阳性样品 178 份, 阳性率为 11.79% (95% CI: 10.16%~13.42%); 检出 MS 阳性样品 392 份, 阳性率为 25.96% (95% CI: 23.75%~28.17%); 检出 MG/MS 双阳性样品 112 份, 混合感染阳性率为 7.42% (95% CI: 6.10%~8.74%)。MG、MS 阳性率差异显著 (MG: $\chi^2 = 108.00, P < 0.05$; MS: $\chi^2 = 204.00, P < 0.05$)。海口、文昌、琼海、儋州 4 个地区均存在 MG、MS 感染 (图 5), 但感染程度存在差异。海口市的 MG 和 MS 阳性率显著高于其余 3 个地区 ($P < 0.05$), 分别为 13.55% (106/782) (95% CI: 11.15%~15.96%) 和 31.71% (248/782) (95% CI: 28.45%~34.98%), 其混合感染阳性率同样高于其余地区, 达到 8.95% (70/782) (95% CI: 6.95%~10.95%)。

2.8.2 不同季节文昌鸡 MG、MS 病原检测

结果显示 (图 6), 不同季节文昌鸡的 MG、MS 阳性率差异显著 (MG: $\chi^2 = 213.00, P < 0.05$; MS: $\chi^2 = 321.00, P < 0.05$)。春季文昌鸡的 MG、MS 阳性检出率显著高于其他季节 ($P < 0.05$), 分别达到 52.26% (81/155) (95% CI: 44.37%~60.15%) 和 42.58% (66/155) (95% CI: 34.77%~50.39%), 其混合感染率达到 28.39% (44/155) (95% CI: 21.27%~35.51%); 而夏季文昌鸡的 MG、MS 阳性检出率最

低, 分别为 1.56% (4/256) (95% CI: 0.04%~3.08%) 和 6.25% (16/256) (95% CI: 3.28%~9.22%), 其 MG、MS 混合感染率为 1.17% (3/256) (95% CI: 0.01%~2.49%)。



组间比较, 字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下同。

图 5 不同地区的文昌鸡 MG、MS 病原检测结果

2.8.3 不同生长阶段文昌鸡的 MG、MS 病原检测

结果显示 (图 7), 在不同生长阶段文昌鸡的咽喉拭子样品中均有 MG、MS 阳性样品检出, 且 MG、MS 的阳性率差异显著 (MG: $\chi^2 = 64.00, P < 0.05$; MS: $\chi^2 = 142.00, P < 0.05$)。成年鸡 MG、MS 的单重及混合感染阳性率均显著高于雏鸡和育成鸡 ($P < 0.05$), 分别达到 16.57% (113/682) (95% CI:

13.78%~19.36%)、34.16% (233/682) (95% CI: 30.60%~37.73%) 和 11.73% (80/682) (95% CI: 9.31%~14.15%)。

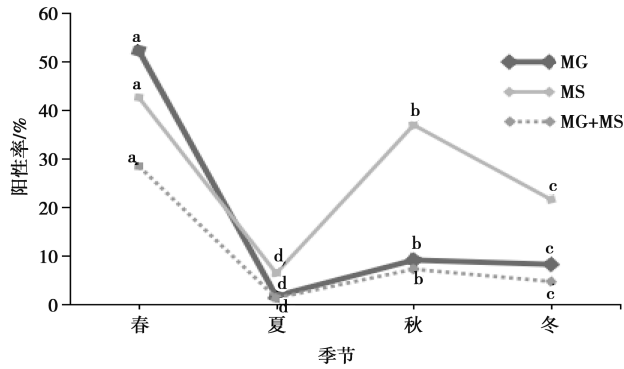


图6 不同季节文昌鸡 MG、MS 的病原检测结果

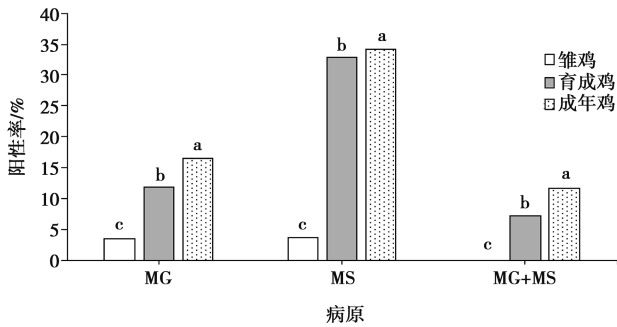


图7 不同生长阶段的文昌鸡 MG、MS 病原检测结果

2.8.4 不同养殖规模文昌鸡场 MG、MS 的病原检测

结果显示 (图8), 不同养殖规模文昌鸡场的 MG、MS 阳性率差异显著 (MG: $\chi^2 = 124.00$, $P < 0.05$; MS: $\chi^2 = 300.00$, $P < 0.05$)。中型文昌鸡场的 MG、MS 阳性检出率最高, 分别达到 38.33% (23/60) (95% CI: 25.93%~50.74%) 和 41.67% (25/60) (95% CI: 29.09%~54.25%); 大型文昌鸡场的 MG、MS 阳性检出率最低, 分别为 8.56% (84/981) (95% CI: 6.81%~10.31%) 和 16.41% (16/981) (95% CI: 17.28%~22.27%); 中型文昌鸡场的 MG、MS 混合感染阳性率最高, 达到 38.33% (23/60) (95% CI: 25.93%~50.74%)。

2.8.5 不同类型文昌鸡 MG、MS 的病原检测

结果显示 (图9), 不同类型的文昌鸡咽拭子样品中均有 MG、MS 阳性样品检出, 且 MG、MS 阳性率差异显著 (MG: $\chi^2 = 76.00$, $P < 0.05$; MS: $\chi^2 = 206.00$, $P < 0.05$)。其中, 商品代肉鸡的 MG、MS 阳性检出率及混合感染阳性率显著高于蛋鸡和种鸡 ($P < 0.05$), 分别为 27.33% (82/300) (95% CI: 22.28%~32.38%)、42.00% (126/300) (95% CI: 36.41%~47.59%) 和 18.67% (56/300) (95% CI:

14.25%~23.08%); 商品代蛋鸡的 MG 阳性检出率最低, 为 3.23% (2/62) (95% CI: 0.01%~7.66%); 种鸡的 MS 阳性检出率最低, 为 20.99% (241/1148) (95% CI: 18.64%~23.35%)。

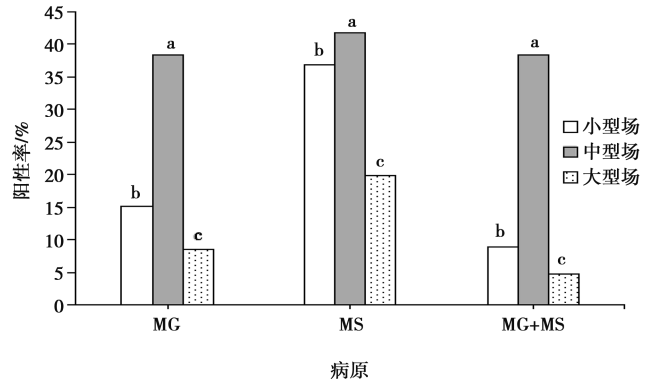


图8 不同养殖规模的文昌鸡场 MG、MS 病原检测结果

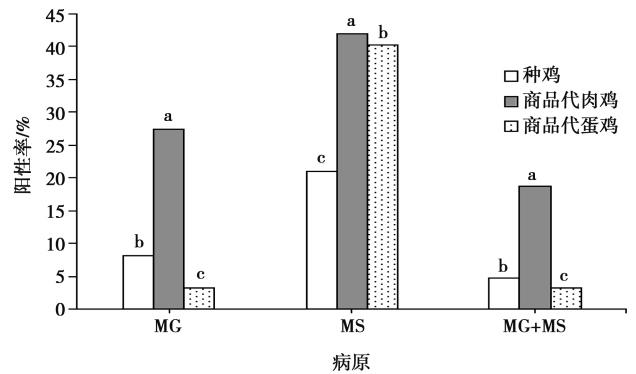


图9 不同类型文昌鸡 MG、MS 病原检测结果

3 讨论

支原体自发现以来便在全球范围内广泛传播, 给家禽养殖业带来严重的经济损失。MG 和 MS 是致病力最强、危害最严重的两类支原体, 一直是规模化养殖的顽疾。鸡群感染 MG 和 MS 后, 会表现出与呼吸道类疾病相似的临床症状, 仅凭肉眼难以区分, 加之部分鸡只会出现 MG、MS 混合感染的情况, 给临床诊断带来困难, 因此亟需一种既可检测病原单一感染, 又可检测混合感染的检测方法。

本试验以 PCR 检测技术为基础, 在一个反应体系中同时加入 MG 和 MS 的引物, 进行双重 PCR 扩增, 经过一系列试验验证和优化, 最终建立 MG、MS 双重 PCR 检测方法。试验结果表明, 本试验所建方法具有良好的敏感性, 最低检测限度达到 2.1×10^2 拷贝/ μL , 灵敏度优于杨斌等^[11]、杨美等^[12] 建立的 MG、MS 双重 PCR 检测技术; 与现有 MG、MS 单重 PCR 检测方法的敏感性相当^[15-16], 且检测时间大大缩短。所建方法与鸡常见病原 ILTV、IBDV、NDV、

MDV 不发生交叉反应,说明该方法特异性良好;在不同时间对 MG、MS 混合质粒进行扩增,均出现清晰条带,说明所建方法具有良好的重复性。此外,本试验还将所建 MG、MS 双重 PCR 检测方法与单一 PCR 行业标准方法的临床检测结果进行了比较分析,发现两种方法 MG 的检测符合率达到 100%,MS 的检测符合率达到 98.83%,且本试验所建 MG、MS 双重 PCR 检测方法的 MS 阳性检出率高于国家农业行业标准检测法,进一步说明所建 MG、MS 双重 PCR 方法更具可靠性,可用于临床检测。然而,本试验所建方法不能鉴别野毒株与疫苗株,因此在临床检测时需明确采样鸡只未免疫 MG、MS 疫苗。

此外,应用所建 MG、MS 双重 PCR 检测方法对海南省文昌鸡主要养殖地区采集的 1 510 份未免疫 MG、MS 疫苗的鸡咽喉拭子进行检测,结果显示 MG 的阳性率为 11.79%,MS 阳性率为 25.96%,MG、MS 混合感染阳性率为 7.42%,说明海南省文昌鸡主要养殖地区存在 MG、MS 感染,且部分呈混合感染,提示当地养殖场应加强对 MG、MS 疫病防控。

检测发现,4 个文昌鸡主要养殖地区均存在不同程度的 MG、MS 感染,以海口的感染情况最为严重,分别为 13.55% 和 31.71%。由于海口是文昌鸡的优势生产区之一^[17],有着较大的文昌鸡出栏量和较快的出栏速度,倘若养殖人员疫病防控意识淡薄,防控不到位,就极有可能造成养殖场内疫病频发,因此,建议海口地区的各养殖场应加强日常消毒工作,严格规范管理制度,注重提升工作人员的防疫意识;而其他 3 个地区的养殖场也仍需加强饲养管理,注重防控 MG、MS。

检测结果提示, MG、MS 在一年四季中均有发生,因此一年四季均需做好 MG、MS 的防控,其中春季的 MG、MS 阳性检出率显著高于其余三季,此结果与姜兰兰等^[18]和马爽等^[19]的调查结果一致。海南春季阴雨连绵,气温忽冷忽热,差异较大,倘若养殖场(户)没有制定合理的应对措施,鸡群将无法适应环境的变化,便会诱使机体抵抗力下降,最终受到 MG 和 MS 侵染;因此建议各养殖场加强对鸡场的散热保暖措施,尤其在春季要尽量避免或减少因低温高湿等环境气候变化诱发的疫病,同时可适当给鸡群饲喂一些抗应激、促免疫的物质,以提高鸡群的抗病力。

不同生长阶段文昌鸡临床样品的检测结果显示, MG 和 MS 的感染率会随着鸡群日龄的增加而呈现出升高趋势,这与孙佳琳等^[20]的调查结果相吻合;推测原因可能是由于鸡群中存在的隐形感染鸡或症状不明显的病鸡没有及时隔离,它们不断向外散播病毒,

加之日常消毒不到位,造成笼舍、器具及周边环境持续污染,而鸡群长时间处于污染的环境下,一旦其抵抗力下降,便会诱发感染;因此建议各养殖场应定期对鸡群开展 MG 和 MS 的监测,及时隔离阳性鸡,同时应在日常清洁中注重对饲喂的器具和笼舍的消毒,多开窗通风,切断病原的传播途径。

不同养殖规模的文昌鸡场 MG、MS 检测结果显示,中型规模的文昌鸡场 MG 和 MS 感染情况最为严重,推测原因可能与养殖场的自身条件和管理水平相关。海南大型文昌鸡场大多拥有良好的硬件设施,严格的管理制度、充足的人手和防疫措施;小型文昌鸡场则多采用散养的饲养方式,鸡群拥有充足的活动空间和流动的新鲜空气;相较而言,中型文昌鸡场的基础设施和标准化生产规范程度不如大型养殖场,饲养空间也没有小型养殖场宽裕,且部分养殖户为追求效益会增加饲养密度,一系列因素增加了鸡群发病的风险^[21],造成阳性率过高的现象;因此,建议中型养殖场合理规划鸡只密度,加强制定疫病防范措施,提高鸡群的饲养管理水平。

在不同养殖类型的文昌鸡中,商品代肉鸡的 MG、MS 感染情况最为严重,这与孙杰龙等^[22]的调查结果一致。这主要是由于肉鸡的饲养周期短,出栏快,日常防疫工作没有种鸡和蛋鸡严格,加之部分养殖户在鸡出栏后没有及时进行清洁消毒或空舍便开始饲养新鸡,导致病原在鸡舍和鸡笼上长期停留,造成新一批鸡受到感染。因此,建议养殖场(户)加强疫病防范,在鸡出栏后务必空舍 2 周以上,并进行彻底的消毒处理后方可进鸡。

综上所述,本研究成功建立了 MG、MS 双重 PCR 检测方法,经验证所建方法具有良好的特异性、敏感性和重复性,与行业标准 PCR 检测方法的符合率达到 98.8% 以上,可用于临床检测。病原学调查结果显示,海南省文昌鸡主要养殖地区存在 MG、MS 感染,建议加强 MG、MS 的防控措施,及时接种疫苗,减少对文昌鸡养殖业的经济损失。

参考文献:

- [1] FEBERWEE A, DE WIT S, DIJKMAN R. Clinical expression, epidemiology, and monitoring of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*: an update [J]. Avian Pathol, 2022, 51 (1): 2-18.
- [2] 胡向腾. 鸡毒支原体感染对蛋鸡生产性能及鸡蛋品质的影响 [J]. 养殖与饲料, 2022, 21 (11): 40-43.
- [3] MAROUF S, MOUSSA I M, SALEM H, et al. A picture of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in poultry in Egypt: phenotypic and genotypic characterization [J]. J King Saud Univ

- Sci, 2020, 32 (3): 2263-2268.
- [4] 王柏林, 周怡, 程振涛. 滑液囊支原体病的研究进展 [J]. 贵州畜牧兽医, 2023, 47 (5): 63-65.
- [5] 陈杨, 孟林春, 郭梦娇, 等. 检测鸡毒支原体抗体的间接 ELISA 方法和 HI 试验方法的建立及初步应用 [J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54 (5): 2062-2072.
- [6] 尹丽萍, 王建, 李昌明, 等. 鸡滑液囊支原体致病模型建立与灭活疫苗免疫效果评价 [J]. 中国兽医杂志, 2023, 59 (8): 67-71.
- [7] YADAV J P, TOMAR P, SINGH Y, et al. Insights on *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in poultry: a systematic review [J]. Anim Biotechnol, 2022, 33 (7): 1711-1720.
- [8] 向勇, 曹伟胜. 禽支原体检测技术进展 [J]. 养禽与禽病防治, 2018 (4): 2-9.
- [9] 王昆, 宫晓炜, 陈启伟, 等. 禽滑液囊支原体诊断与防控技术研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018 (9): 31-34.
- [10] SABRI S, KHANNOUS L, FERRÉ S, et al. First molecular investigation to detect avian *Mycoplasma* species in clinical samples from laying-hen farms in Tunisia [J]. BMC Vet Res, 2024, 20 (1): 459.
- [11] 杨斌, 朝洛门, 陈志鹏, 等. 鸡毒支原体与鸡滑液囊支原体双重 PCR 检测方法的建立 [J]. 畜牧与饲料科学, 2019, 40 (2): 12-15.
- [12] 杨美, 程振涛, 周怡, 等. 鸡毒支原体和鸡滑液囊支原体双重 PCR 检测方法的建立 [J]. 动物医学进展, 2020, 41 (6): 27-31.
- [13] 朱小甫, 吴旭锦, 李怡婷, 等. 鸡毒支原体与滑液囊支原体双重 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 动物医学进展, 2021, 42 (6): 31-35.
- [14] 中华人民共和国农业部. 禽支原体 PCR 检测方法: NY/T 553-2015 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 1-5.
- [15] 蔡晓庆, 张妹, 陈文平. 鸡毒支原体 PCR 检测方法的建立 [J]. 山东畜牧兽医, 2023, 44 (3): 6-9.
- [16] 丁美娟, 卢凤英, 尹秀凤, 等. 应用 PCR 快速检测鸡滑液囊支原体的研究 [J]. 中国家禽, 2015, 37 (19): 68-70.
- [17] 符安, 丰舟, 陈益勇, 等. 文昌鸡养殖企业发展现状、存在的问题及解决办法 [J]. 中国禽业导刊, 2022, 39 (11): 28-32.
- [18] 姜兰兰, 沈光年, 周德刚, 等. 北京市鸡毒支原体和滑液囊支原体血清学调查 [J]. 中国动物检疫, 2020, 37 (6): 25-29.
- [19] 马爽, 郭莉莉, 宋新宇, 等. 鸡滑液囊支原体感染的流行病学调查与分析 [J]. 中国家禽, 2016, 38 (23): 68-71.
- [20] 孙佳琳, 李继东, 司朵朵, 等. 2020—2021 年宁夏地区部分城市鸡滑液囊支原体病的血清学调查与分析 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023 (14): 82-85.
- [21] 雷元元, 何生虎, 王静, 等. 鸡毒支原体病研究进展 [J]. 农业科学研究, 2014, 35 (3): 39-42.
- [22] 孙杰龙, 丁宁, 刘頌阳, 等. 益阳地区鸡滑液囊支原体感染的血清学调查与分析 [J]. 中国畜禽种业, 2023, 19 (6): 169-172.