

## 研究报告

## 山东某规模化鸡场鸡毒支原体的分离鉴定、基因分型、耐药性和致病性分析

周峰<sup>1,2</sup>, 王晨燕<sup>1</sup>, 侯博<sup>\*1</sup>, 郭锦玥<sup>2</sup>

1 福建省农业科学院畜牧兽医研究所 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013

2 佛山科学技术学院 生命科学与工程学院, 广东 佛山 528231

周峰, 王晨燕, 侯博, 郭锦玥. 山东某规模化鸡场鸡毒支原体的分离鉴定、基因分型、耐药性和致病性分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 4230-4244.

ZHOU Feng, WANG Chenyan, HOU Bo, GUO Jinyue. Isolation, identification, genotyping, antibiotic resistance, and pathogenicity of *Mycoplasma gallisepticum* from a chicken farm in Shandong[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 4230-4244.

**摘要:**【背景】鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*, MG)主要引起家禽慢性呼吸道疾病, 不同地区 MG 菌株的耐药性和致病性差异大, 给临床防控增加了难度。【目的】明确山东省烟台市某规模化鸡场 MG 分离株的基因分型、耐药情况及致病力, 为该地区 MG 防控提供科学依据。【方法】从 MG 阳性鸡群上腭裂拭子分离、纯化获得 MG 分离株, 利用 *atpG*、*plsC*、*mraW*、*ugpA*、*DUF3196*、*lgT* 和 *dppC* 共 7 个管家基因进行多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)并构建系统发育树。测定分离株对金霉素、大观霉素、林可霉素、泰乐菌素、泰万菌素、泰妙菌素、沃尼妙林和多西环素的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 并对相关耐药基因 23S rRNA 基因 V 结构域、L4 及 L22 蛋白基因进行测序分析。通过点眼攻毒和气管攻毒两种方式感染 28 日龄 SPF 鸡, 评价感染 10、20 和 30 d 后气囊炎的发病率、气管组织 MG 载量和病理损伤。【结果】分离纯化获得 9 株 MG, 并首次发现菌株 YTX2、YTX5.6、YTX11、YTX12、YTX13、YTX14 和 YTX15 的管家基因 *plsC* 和 *mraW* 为新的等位基因, ID 号分别为 33 和 31, 这 7 株 MG 分离株属于 ST97 型, 而菌株 YTX9 和 YTX10 属于 ST16 型。所有 MG 分离株对沃尼妙林和泰妙菌素敏感(MIC $\leq$ 0.25  $\mu$ g/mL), 对泰万菌素和多西环素次之(MIC $\leq$ 4  $\mu$ g/mL), 对金霉素和林可霉素有一定程度耐药(MIC $\geq$ 16  $\mu$ g/mL); 属于 ST97 的 7 个 MG 分离株对泰乐菌素存在中等程度耐药(MIC: 4–8  $\mu$ g/mL); 选取菌株 YTX5.6、YTX2 和 YTX10 对耐药性相关的 23S rRNA 基因 V 结构域、L4 和 L22 蛋白基因测序分析, 菌株 YTX5.6 和 YTX2 在 23S rRNA 基因 V 结构域发生 A2069G 突变; 菌株 YTX5.6 和 YTX2 的 L4 蛋白基因出现

资助项目: 福建省属公益类科研院所基本科研专项(2024R1025004); 福建省农业科学院科技创新团队(CXTD2021014-3); 福建省农业科学院项目(2023KTP04); 福建省农业科学院“5511”协同创新重点项目(XTCXGC2021008)

This work was supported by the Basic Scientific Research Program of Fujian Province (2024R1025004), the Sci-Tech Innovation Team of Fujian Academy of Agricultural Sciences (CXTD2021014-3), the Research Program of Fujian Academy of Agricultural Sciences (2023KTP04), and the “5511” Collaborative Innovation Project (XTCXGC2021008).

\*Corresponding author. E-mail: houbohouwei@126.com

Received: 2024-01-18; Accepted: 2024-04-15; Published online: 2024-05-30

G568T 突变, 在 L22 蛋白基因上出现 T102C、T129C、T252C、C336T 和 G404A 突变; 对泰万菌素、泰乐菌素、泰妙菌素、沃尼妙林和多西环素敏感的 YTX10 株与对照菌株 MG  $R_{low}$  株序列一致, 未发生突变。在感染后 10、20 和 30 d, 菌株 YTX5.6 气管攻毒组气囊炎发病率分别为 80%、60%和 80%; 菌株 YTX10 气管攻毒组仅在感染后 20 d 和 30 d 出现气囊炎, 发病率分别为 40%和 20%, 其余组在整个实验过程中均未发现明显气囊炎。气管攻毒组的鸡在整个感染过程中气管黏膜增厚情况均比点眼攻毒组严重( $P<0.05$ ), 菌株 YTX5.6 气管攻毒组在感染后第 20 天气管黏膜增厚最严重, 平均厚度为 300.6  $\mu\text{m}$ 。菌株 YTX5.6 和 YTX10 气管攻毒方式在感染 10、20 和 30 d 后, 气管中的 MG 载量均比菌株 YTX5.6 和 YTX10 点眼攻毒方式高。【结论】本研究从山东省烟台市某规模化鸡群共分离出 9 株 MG 菌株, 分别属于 ST97 和 ST16 基因型, 分离株对目前常用抗生素存在不同程度的耐药性, 动物感染试验表明不同基因型菌株存在不同致病力。

关键词: 鸡毒支原体; 耐药性; 多位点序列分型; MIC 测定; 致病性

## Isolation, identification, genotyping, antibiotic resistance, and pathogenicity of *Mycoplasma gallisepticum* from a chicken farm in Shandong

ZHOU Feng<sup>1,2</sup>, WANG Chenyan<sup>1</sup>, HOU Bo<sup>\*1</sup>, GUO Jinyue<sup>2</sup>

1 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences/Fujian Animal Disease Control Technology Development Center, Fuzhou 350013, Fujian, China

2 School of Life Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528231, Guangdong, China

**Abstract:** [Background] *Mycoplasma gallisepticum* (MG) is the main cause of chronic respiratory diseases in poultry. The different susceptibility to antibiotics and pathogenicity of MG strains from different regions increases the difficulty in the prevention and control of MG infection. [Objective] To clarify the genotypes, antibiotic resistance, resistance gene mutations, and pathogenicity of MG isolates from a chicken farm in Yantai, Shandong, so as to provide a scientific basis for the prevention and control of MG in this area. [Methods] The MG isolates were obtained from the cleft palate swabs of chicken tested positive for MG. Seven housekeeping genes (*atpG*, *plsC*, *mraW*, *ugpA*, *DUF3196*, *lgT*, and *dppC*) were used for multilocus sequence typing (MLST), and a phylogenetic tree was constructed. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of eight antibiotics including chlortetracycline, spectinomycin, lincomycin, tylosin, tylvalosin, tiamulin, valnemulin, and doxycycline against the isolates were determined. The 23S rRNA V domain and L4 and L22 protein genes were sequenced. SPF-grade chickens of 28 days old were infected by eye challenge and trachea challenge, respectively. [Results] Nine MG isolates were obtained in this study, including seven isolates (YTX2, YTX5.6, YTX11, YTX12, YTX13, YTX14, and YTX15) of sequence type 97 (ST97) and two isolates (YTX9 and YTX10) of ST16. New alleles of *plsC* and *mraW* were identified in the seven strains of ST97, with the ID of 33 and 31, respectively. All the MG isolates were sensitive to valnemulin and tiamulin

(MIC $\leq$ 0.25  $\mu$ g/mL), moderately sensitive to tylvalosin and doxycycline (MIC $\leq$ 4  $\mu$ g/mL), and resistant to chlortetracycline and lincomycin (MIC $\geq$ 16  $\mu$ g/mL). The seven MG isolates of ST97 were moderately resistant to tylosin (MIC: 4–8  $\mu$ g/mL). The mutation A2069G was identified in the V domain of the 23S rRNA gene in strains YTX5.6 and YTX2. The mutation G568T occurred in the L4 protein gene of strains YTX5.6 and YTX2, and the mutations T102C, T129C, T252C, C336T, and G404A occurred in the L22 protein gene. The strain YTX10 sensitive to tylosin, tylvalosin, tiamulin, valnemulin, and doxycycline showed the same sequence compared with the control strain MG  $R_{low}$ , with no mutation detected. The morbidity of air sacculitis was 80%, 60%, and 80%, respectively, 10, 20, and 30 days after tracheal challenge with the strain YTX5.6. Air sacculitis occurred 20 and 30 days after tracheal challenge with YTX10, with the morbidity of 40% and 20%, respectively. The tracheal mucosal thickening was severer in the tracheal challenge group than in the eye challenge group ( $P<0.05$ ). Severe tracheal thickening was observed 20 days after tracheal challenge with strain YTX5.6, with an average thickness of 300.6  $\mu$ m. Tracheal challenge with strain YTX5.6 or YTX10 resulted in significantly higher MG loads than eye challenge with same strain 10, 20, and 30 days post-infection. **[Conclusion]** In this study, nine MG strains of ST97 and ST16 were isolated from a chicken farm in Yantai, Shandong. The nine isolates demonstrated varied resistance to antibiotics and different pathogenicity to SPF-grade chickens.

**Keywords:** *Mycoplasma gallisepticum*; antibiotic resistance; multilocus sequence typing; determination of minimum inhibitory concentration; pathogenicity

鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*, MG)主要感染家禽,引起鸡的慢性呼吸道疾病(chronic respiratory disease, CRD)和火鸡的传染性鼻窦炎,临床症状包括打喷嚏、咳嗽、流鼻涕和呼吸道啰音,火鸡眶下鼻窦肿胀<sup>[1-2]</sup>。MG常与其他病原发生混合感染,如鸡传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)<sup>[3]</sup>,新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)及大肠杆菌等<sup>[4]</sup>,导致更严重的呼吸道症状。近10年间MG感染和流行状况仍然严峻,李桂喜等<sup>[5]</sup>在2017年对江苏、山东、河南、安徽等地的6986例蛋鸡病例调查发现MG感染率为14.21%;Wei等<sup>[6]</sup>于2022年对河南、河北以及福建等地区共1250份鸡气管和肺脏样品进行检测发现MG阳性率达75.04%。

多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)于1988年首次被用于脑膜炎奈瑟菌

(*Neisseria meningitidis*)的基因分型,此后MLST成为细菌基因分型的“金标准”<sup>[7]</sup>。用于MLST基因分型的管家基因需满足稳定表达、维持功能、必需性(丧失该基因则是致命的)和保守性的要求<sup>[8-9]</sup>。2019年Ghanem等<sup>[10]</sup>提出一种用于MG菌株基因分型的MLST方法,筛选了符合MLST分型要求的7个管家基因*atpG*、*plsC*、*mraW*、*ugpA*、*DUF3196*、*lgT*和*dppC*,根据Hunter和Gaston DI值将管家基因按顺序拼接后其DI值可信区间大于95%,该方法可准确对MG菌株进行基因分型,对MG遗传关系进行分类。

大环内酯类抗生素在50S核糖体亚基的孔道内主要与23S rRNA基因的V结构域的2058位的腺嘌呤核苷酸相互作用,并且大环内酯类抗生素还与23S rRNA基因II结构域748位的鸟嘌呤核苷酸以及核糖体蛋白L4和L22的表面产生

额外相互作用<sup>[11-12]</sup>。已有研究表明 MG 对大环内酯类抗生素的耐药性与 23S rRNA 基因的 II 或 V 结构域的点突变, 以及编码核糖体蛋白 L4 和 L22 的 *rplD* 和 *rplV* 基因突变密切相关<sup>[13-15]</sup>。Li 等对鸡毒支原体 PG31 和 S6 株在亚抑菌浓度的泰妙菌素和沃尼妙林中连续传代后形成的耐药菌株研究证实核糖体蛋白 L3 未发生突变, 而在 23S rRNA 基因 V 结构域的 2 058、2 059、2 061、2 447 和 2 503 位置发生了突变, 这些突变对于林可霉素、氯霉素和氟苯尼考具有交叉耐药性, 并且在 A2058G 或 A2059G 位点的突变对于大环内酯类抗生素红霉素、替米考星和泰乐菌素也具有交叉耐药性<sup>[15-16]</sup>。王建国<sup>[17]</sup>通过体外诱导形成的对大环内酯类抗生素和林可霉素耐药的 MG 菌株与敏感株相比, L4 和 L22 蛋白基因序列同样出现了多处突变。MG 致病力与黏附蛋白(GapA、CremA、PlpA)、热休克蛋白(GroE1)、相位变化蛋白(PvpA)和免疫逃避相关蛋白 VlhA 等有关<sup>[18]</sup>。此外, Levisohn 等<sup>[19]</sup>采用不同滴度 MG 以气溶胶或气管攻毒的方法对鸡进行人工感染, 通过对气囊损伤和发病情况进行评估, 发现 MG 对鸡的致病力与攻毒途径和攻毒剂量有关。

本研究对山东省烟台市疑似 MG 感染的某规模养殖场鸡群采集上腭裂拭子样品进行 MG 病原检测、分离和鉴定, 并对 MG 分离株进行 MLST 基因分型; 为了解 MG 分离株的耐药情况, 测定了治疗支原体感染的常用抗生素的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)及相关耐药基因的突变情况; 选取代表性菌株人工感染 28 日龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)鸡, 通过临床症状、病理变化和气管病原载量等评价不同菌株及不同攻毒方式对 28 日龄 SPF 鸡的致病力。因此, 本研究将通过分析 MG 的流行、基因分型、耐药性及

致病性, 以期后续开展鸡毒支原体病的防控技术研究提供科学理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

25 日龄 SPF 鸡, 济南斯帕法斯家禽有限公司, 动物实验经过福建省农业科学院畜牧兽医研究所动物伦理委员会审批(批准号为 FAAS-AMC202302)。2022 年 8 月采集的山东省烟台市某规模化鸡场疑似禽支原体感染鸡群的上腭裂拭子样品 20 份。

FM4 禽支原体液体培养基(含酚红)和固体培养基按照参考文献[20]配制。2×Rapid Taq Master Mix 和 2×Taq Pro HS probe Master Mix, Vazyme 公司; DL2000 DNA Marker, 北京庄盟国际生物基因科技有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技有限公司; 泰妙菌素、泰万菌素、多西环素、泰乐菌素、沃尼妙林、林可霉素、大观霉素和金霉素, 武汉回盛生物科技股份有限公司; SPF 雏鸡配合饲料, 科澳协力(天津)饲料有限公司; 商品化的 MG ts-11 疫苗, 澳大利亚生物资源有限公司。SPF 鸡隔离器, 苏州市冯氏实验动物设备有限公司; 0.45 μm 滤器, Millipore 公司; 荧光定量 PCR 仪, Roche 公司; 普通光学显微镜, Nikon 公司。

### 1.2 临床 MG 的分离和鉴定

将采集的上腭裂拭子样品置于禽支原体液体培养基中, 轻微振荡后经 0.45 μm 滤器过滤, 以 20%接种量接种至新鲜禽支原体液体培养基, 37 °C 静置培养, 当培养基由玫瑰红转变为橘黄或黄色时为疑似支原体生长并进行 PCR 检测。按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取上腭裂拭子样品或培养物的 DNA, 按照 2015 年国家行业标准《禽支原体 PCR 检测方法》中的 MG 特异性引物 MG-14F 和 MG-13R (表 1)进行

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences of this study

| 引物名称<br>Primer name | 引物序列<br>Sequence (5'→3')                | 片段大小<br>Size (bp) | 参考文献<br>Reference |
|---------------------|---|-------------------|-------------------|
| MG-14F              | GAGCTAATCTGTAAACTTGGTC                  | 185               | [21]              |
| MG-13R              | GCT TCC TTG CGG TTA GCA AC              |                   | [21]              |
| <i>atpG</i> -F      | GCAATGAAKATGCTTTCAACCG                  | 668               | [10]              |
| <i>atpG</i> -R      | CACACTTTGGATTCAATTAACAACC               |                   | [10]              |
| <i>plsC</i> -F      | GTTGCTTCTGATAGGTTTGCTG                  | 647               | [10]              |
| <i>plsC</i> -R      | CAAAGAAAACCGCTTTAAGACCG                 |                   | [10]              |
| <i>mraW</i> -F      | CAAGGACGAATAGTTTGGCTG                   | 822               | [10]              |
| <i>mraW</i> -R      | GGTTTGGCGGTCATAGTTAC                    |                   | [10]              |
| <i>ugpA</i> -F      | GGTTAAGATTTGGGTGCCATTAG                 | 843               | [10]              |
| <i>ugpA</i> -R      | CGTAAGAATAAGCCGTATAAAGTTCC              |                   | [10]              |
| <i>DUF3196</i> -F   | TTGTGGTTAGTGGGGATAATGAA                 | 740               | [10]              |
| <i>DUF3196</i> -R   | GGRTAAGAAGGATAATAATCTTGCAT              |                   | [10]              |
| <i>lgT</i> -F       | CATCAGCATAAAAARAACATTTTCAGAG            | 1 071             | [10]              |
| <i>lgT</i> -R       | CAGGCAATCATAACAATAAACGATAG              |                   | [10]              |
| <i>dppC</i> -F      | CTTCTTAATGAGTCTTGAACGG                  | 956               | [10]              |
| <i>dppC</i> -R      | GAAACTGACGAATTTGTTGATCC                 |                   | [10]              |
| 23S rRNA S1-F       | TCAACATATCTCCGCATTTTA                   | 3 575             | [16]              |
| 23S rRNA S1-R       | ATCTTTATTGTAAGCGTTTCA                   |                   | [16]              |
| F-23S rRNA S1-F     | TTGTCGAGTGTTTTTGCGCC                    | 1 961             | This study        |
| F-23S rRNA S1-R     | GTGTCGTTTTGTTGGCGTGA                    |                   | This study        |
| 23S rRNA S2-F       | AAGGCTTATATAGCTACATTG                   | 3 390             | [16]              |
| 23S rRNA S2-R       | CGCTAAATCTTAATCGTTAAA                   |                   | [16]              |
| 23S rRNA V-F        | AATCAAAGCTCCCGACTG                      | 885               | [16]              |
| 23S rRNA V-R        | GATGCTTTCAGCGTTTAT                      |                   | [16]              |
| L4-F                | CAGTAATGATTTTCAGGAGCTAT                 | 887               | [17]              |
| L4-R                | TACTTTCTTGGTTCTGACA                     |                   | [17]              |
| L22-F               | AAACTAGGTGAATTTTCTCCTAC                 | 625               | [17]              |
| L22-R               | TAATCTTTTCGTCCTGAACA                    |                   | [17]              |
| qPCR-F              | F: TTGCTAACCGCAAGGAAGC                  | 110               | [22]              |
| qPCR-R              | CTCCATAGAAAGGAGGTAATCCA                 |                   | [22]              |
| qPCR-Probe          | 6-FAM-CCGGTGATTGGAGTTAAGTCGTAACAAG-BHQ1 |                   | [22]              |

PCR 检测<sup>[21]</sup>, PCR 产物大小为 185 bp。PCR 总反应体系(25  $\mu$ L): 2 $\times$ Rapid *Taq* Master Mix 12.5  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L, 样品 DNA 2  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。同时以 ts-11 疫苗为阳性对照, PCR 结束进行琼脂糖凝胶电泳检测。

将 PCR 检测阳性的样品继续传 3-5 代, 直

至能够稳定传代。将能够稳定传代并且 PCR 鉴定为 MG 阳性的样品稀释至 10<sup>-3</sup> 和 10<sup>-4</sup>, 均匀涂布在支原体固体培养基后 37  $^{\circ}$ C 培养 24-96 h, 挑取单个菌落于支原体液体培养基中 37  $^{\circ}$ C 静置培养, 对培养菌液以上述方法进行 PCR 检测, 选择 MG 阳性菌液继续纯化, 重复上述过程 3 次后扩大培养, 记为 P1 代, -70  $^{\circ}$ C 保存备用。

将 MG 分离株 P1 代保存的菌液用支原体液体培养基以 10 倍连续稀释,分别取  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  这 4 个稀释度的菌液 100  $\mu\text{L}$  加入至 1 mL 支原体液体培养基中,每个稀释度设置 6 个重复,放入 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 10 d,阴性对照不变色(红色),而稀释菌液变色(变成黄色或橘黄色)则为阳性,按照 Reed-Muench 法计算半数颜色变化单位(color change units 50,  $\text{CCU}_{50}$ )<sup>[23]</sup>。

### 1.3 MG 分离株的 MLST 基因分型

以 MG 分离菌株的 DNA 为模板,按照文献[10]中 MG 菌株 MLST 基因分型的方法,对 7 个管家基因 *atpG*、*plsC*、*mraW*、*ugpA*、*DUF3196*、*lgT* 和 *dppC* 按照表 1 中的引物序列进行 PCR 扩增后将产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,将管家基因测序结果上传 PubMLST 网站(<http://pubmlst.org/mgallisepticum/>),分配对应的 ST 型。按顺序对分离菌株的管家基因进行拼接,并在 PubMLST 数据库中获取国内外的 MG 菌株基因序列,利用 MEGA 7 软件比对并构建系统发育树。

### 1.4 MG 分离株的 MIC 测定

将金霉素、泰万菌素、泰乐菌素、泰妙菌素、沃尼妙林、多西环素、林可霉素及大观霉素准确配制成 1 280  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度,-40  $^{\circ}\text{C}$  保存待用。将含有  $10^5$   $\text{CCU}_{50}/\text{mL}$  的 MG 菌液置于 96 孔板中,加入上述抗生素并连续 2 倍稀释成 0.062 5–32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,在第 11 孔设置阳性对照( $10^5$   $\text{CCU}_{50}/\text{mL}$  MG 菌液),在第 12 孔设置阴性对照(支原体液体培养基),每孔体积为 100  $\mu\text{L}$ ,在 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 7 d。当阳性对照颜色由玫瑰红变黄色,而阴性对照无颜色变化,以抑制支原体液体培养基颜色变化的最低抗生素浓度为 MG 分离株的最小抑菌浓度。

### 1.5 MG 分离株的耐药基因分析

23S rRNA 基因有 2 个拷贝的 V 结构域,分

别在 23S rRNA 的 2 个位置。采用表 1 中的引物 23S rRNA S1-F/R、F-23S rRNA S1-F/R 和引物 23S rRNA S2-F/R 分别扩增 MG 分离株的 23S rRNA 基因的 2 个 V 结构域序列。PCR 反应体系(25  $\mu\text{L}$ ): 2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 7.5  $\mu\text{L}$ ,模板 DNA 3  $\mu\text{L}$ ; PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  120 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。以上述 PCR 产物为模板,利用引物 23S rRNA V-F/R 扩增 23S rRNA 基因 2 个不同的 V 结构域序列。PCR 反应体系同前。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。参照文献[17]利用 L4-F/R 和 L22-F/R 引物(表 1)扩增 L4 和 L22 蛋白基因序列。将扩增获得的 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,将测序结果与 NCBI 网站上获得的 MG  $R_{\text{low}}$  株相关耐药基因在 GENEDOC 软件中比对并分析。

### 1.6 MG 分离株对 28 日龄 SPF 鸡的致病力分析

根据 MLST 基因分型结果选择 YTX5.6 和 YTX10 分离株感染 28 日龄 SPF 鸡。将 75 羽 28 日龄 SPF 鸡随机分为 5 组,每组 15 羽,G1 组用无菌新鲜支原体液体培养基进行点眼和气管接种作为阴性对照,G2 组每羽点眼攻毒 YTX10 菌液 100  $\mu\text{L}$  (含  $10^7$   $\text{CCU}_{50}$ ),G3 组每羽气管攻毒 YTX10 菌液 200  $\mu\text{L}$  (含  $10^7$   $\text{CCU}_{50}$ ); G4 组每羽点眼攻毒 YTX5.6 菌液 100  $\mu\text{L}$  (含  $10^7$   $\text{CCU}_{50}$ ),G5 组每羽气管攻毒 YTX5.6 菌液 200  $\mu\text{L}$  (含  $10^7$   $\text{CCU}_{50}$ )。

攻毒后每日观察 2 次,包括饮水和采食变化及有无气管啰音、流鼻涕、咳嗽、体重减轻等。感染后第 10、20、30 天每组随机选取 5 只鸡剖杀,观察鼻道、气管是否出现卡他性渗出,

脸部位是否肿胀,气囊有无浑浊增厚或干酪样物质渗出。取气管上 1/2 段于 PBS 中 $-40^{\circ}\text{C}$ 保存,下 1/2 段气管于 10%的甲醛溶液中固定后进行组织病理学分析。

按照 2015 年国家行业标准《禽支原体 PCR 检测方法》中的样品前处理方式<sup>[21]</sup>,将采集的气管振荡 120 s,吸取悬液 1 mL 于 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 10 min,小心弃去上清液后按照细菌 DNA 提取试剂盒说明书提取核酸,参照文献<sup>[22]</sup>利用表 1 中的引物和探针进行 qPCR 检测,反应体系(20  $\mu\text{L}$ ):  $2\times\text{Taq Pro HS probe Master Mix}$  10  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物 qPCR-F/R (10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.7  $\mu\text{L}$ ,探针 qPCR-Probe (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.6  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 5  $\mu\text{L}$ , DNA 3  $\mu\text{L}$ ; 反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  120 s;  $95^{\circ}\text{C}$  10 s,  $60^{\circ}\text{C}$  35 s (收集荧光信号),共 40 个循环,并设置标准曲线计算 MG 在不同样品中的拷贝数。

将固定的气管经酒精脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、常规苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE)染色、脱水、透

明和固封后,在普通光学显微镜下观察气管黏膜损伤和增厚情况,平均取气管 4 个对称位置进行气管黏膜厚度测量,并计算平均值,结果以平均值 $\pm$ 标准差进行表示。

## 1.7 统计分析

使用 IBM SPSS Statistics 26 软件对各组气管中 MG 载量和气管黏膜厚度进行单因素方差分析,当  $P>0.05$  为无显著差异,当  $P<0.05$  时表示差异显著, $P<0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 MG 的分离、纯化和 CCU<sub>50</sub> 测定

对 20 份疑似禽支原体感染鸡群上腭裂拭子进行培养和检测,其中有 9 个样品检测出 MG 阳性(图 1A),PCR 产物大小约为 185 bp。通过分离纯化和鉴定,共分离 YTX2、YTX5.6、YTX9、YTX10、YTX11、YTX12、YTX13、YTX14 和 YTX15 这 9 株 MG 分离株,并且均来自种鸡群。分离株在支原体固体培养基上呈现典型的“煎蛋样”或“太阳状”菌落(图 1B)。测

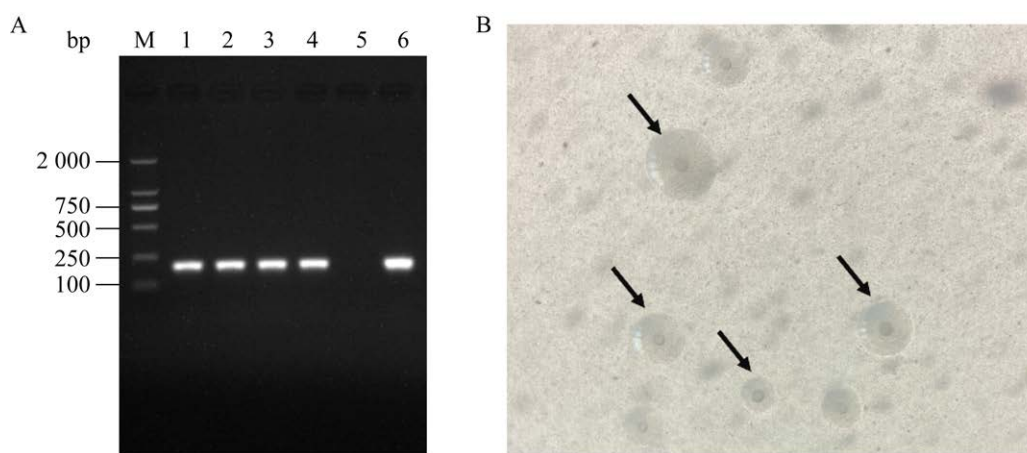


图 1 MG 分离株的 PCR 鉴定结果(A)和菌落形态(B) M: DNA 标准分子物; 1-4: 临床样品培养物; 5: 阴性对照; 6: 阳性对照

Figure 1 PCR identification results (A) and colony morphology (B) of MG isolates. M: DNA marker; 1-4: Cultures of clinical samples; 5: Negative control; 6: Positive control.

定分离纯化的 P1 代培养物的 CCU<sub>50</sub>, 其中菌株 YTX5.6 和 YTX10 分别为 10<sup>8.5</sup> CCU<sub>50</sub>/mL 和 10<sup>8</sup> CCU<sub>50</sub>/mL, 其余 MG 分离株 CCU<sub>50</sub> 均大于 10<sup>5</sup> CCU<sub>50</sub>/mL, 其中菌株 YTX2、YTX12、YTX13 大于 10<sup>7</sup> CCU<sub>50</sub>/mL。

## 2.2 MG 分离株的 MLST 分型及基因进化分析

以 MG 菌株 ts-11 DNA 为模板, 对 7 对管家基因(*atpG*: 668 bp; *dppC*: 956 bp; *DUF3196*: 740 bp; *lgT*: 1 071 bp; *mraW*: 822 bp; *plsC*: 647 bp 和 *ugpA*: 843 bp) 进行 PCR 扩增, 各管家基因所扩增片段大小符合预期(图 2)。将 9 株 MG 分离株的管家基因经 PCR 扩增和测序后, 测序结果在 PubMLST 网站(<http://pubmlst.org/mgallisepticum/>)上分配序列型, 9 株 MG 分离株基因型分别是 ST16 和 ST97, 其中菌株 YTX9 和 YTX10 与美国 F 株为 ST16 型, 而菌株 YTX2、YTX5.6、YTX11、YTX12、YTX13、YTX14 和 YTX15 属于首次被发现的新的基因型 ST97, 其中管家基因 *plsC* 和 *mraW* 为首次被发现的等位基因, ID 号分别为 33 和 31 (表 2)。

9 株 MG 分离株的管家基因序列按照一定顺序串联后, 与 PubMLST 数据库的国内外 MG

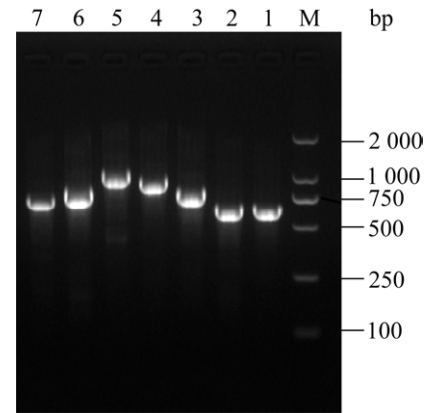


图 2 MLST 管家基因 PCR 扩增产物电泳结果

Figure 2 The results of PCR amplification for MLST housekeeping genes. M: DL2000 DNA Marker; 1: *plsC*; 2: *atpG*; 3: *mraW*; 4: *dppC*; 5: *lgT*; 6: *ugpA*; 7: *DUF3196*.

代表性菌株序列进行比对, 通过 MEGA 7 构建系统发育树发现属于 ST16 基因型的 YTX9 和 YTX10 株与美国 F 株属于同一分支, 而属于 ST97 基因型的分离株 YTX2 (id504)、YTX5.6 (id505)、YTX11 (id506)、YTX12 (id507)、YTX13 (id508)、YTX14 (id509) 和 YTX15 (id510) 与 2022 年和 2023 年从我国浙江、云南、江苏、四川、广东、广西和湖北等地分离的菌株位于同一分支(图 3)。

表 2 MG 分离株管家基因等位基因序列号和菌株 ST 型

Table 2 Serial numbers of housekeeping gene alleles and strain ST types of MG isolated strains

| Strain | <i>atpG</i> | <i>plsC</i> | <i>dppC</i> | <i>mraW</i> | <i>ugpA</i> | <i>DUF3196</i> | <i>lgT</i> | ST        |
|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|------------|-----------|
| YTX2   | 3           | <b>33</b>   | 13          | <b>31</b>   | 1           | 4              | 44         | <b>97</b> |
| YTX5.6 | 3           | <b>33</b>   | 13          | <b>31</b>   | 1           | 4              | 44         | <b>97</b> |
| YTX9   | 2           | 9           | 28          | 2           | 4           | 3              | 6          | 16        |
| YTX10  | 2           | 9           | 28          | 2           | 4           | 3              | 6          | 16        |
| YTX11  | 3           | <b>33</b>   | 13          | <b>31</b>   | 1           | 4              | 44         | <b>97</b> |
| YTX12  | 3           | <b>33</b>   | 13          | <b>31</b>   | 1           | 4              | 44         | <b>97</b> |
| YTX13  | 3           | <b>33</b>   | 13          | <b>31</b>   | 1           | 4              | 44         | <b>97</b> |
| YTX14  | 3           | <b>33</b>   | 13          | <b>31</b>   | 1           | 4              | 44         | <b>97</b> |
| YTX15  | 3           | <b>33</b>   | 13          | <b>31</b>   | 1           | 4              | 44         | <b>97</b> |

加粗部分为新分配等位基因型和 ST 型

The novel allele and ST types are shown in bold.



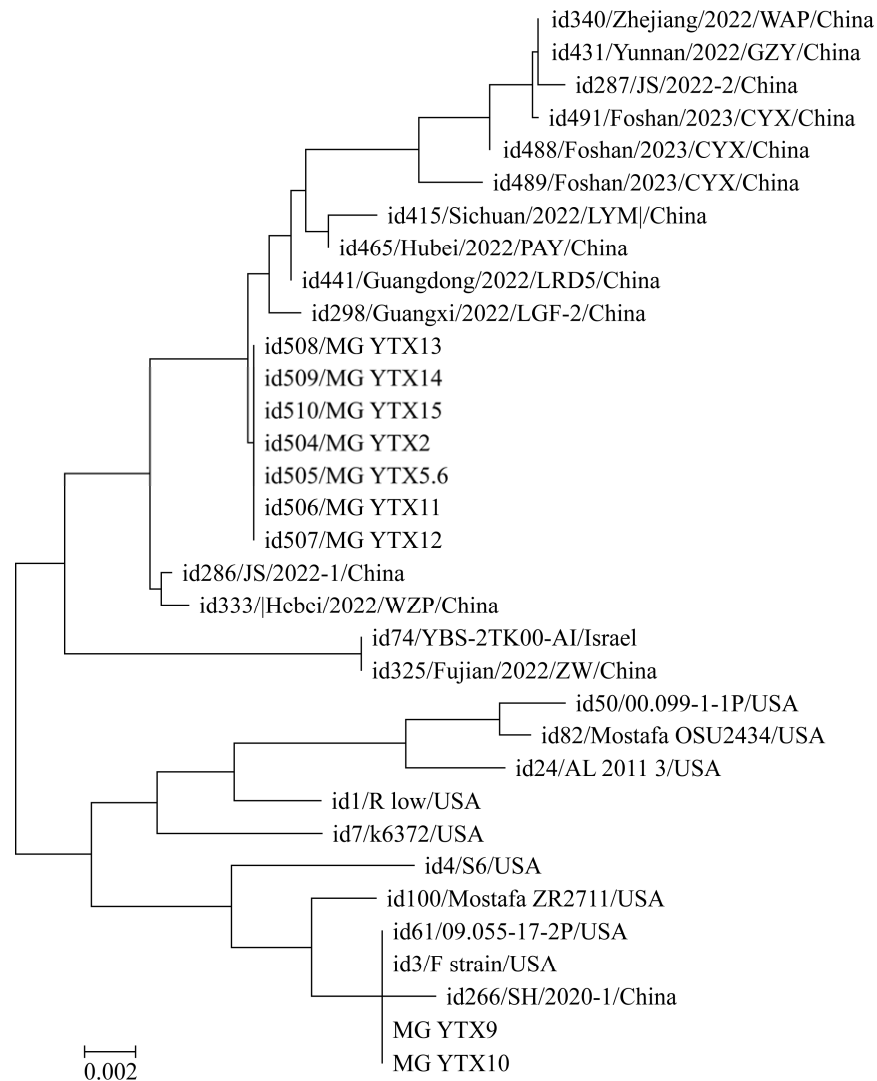


图3 9株MG分离株与国内外参考菌株的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of 9 MG isolates and reference strains from domestic and overseas.

### 2.3 MG分离株的MIC测定和耐药基因分析结果

MIC测定显示菌株YTX9和YTX10对金霉素、泰万菌素、泰乐菌素、泰妙菌素、沃尼妙林、多西环素、林可霉素和大观霉素共8种抗生素敏感性与疫苗菌株ts-11结果较一致,而菌株YTX2、YTX5.6、YTX11、YTX12、YTX13、YTX14和YTX15则对泰妙菌素、沃尼妙林较敏感( $MIC \leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ ),对泰万菌素、多西环

素次之( $MIC: 0.5-1.0 \mu\text{g/mL}$ ),对泰乐菌素、金霉素、林可霉素和大观霉素则存在不同程度的耐药( $MIC \geq 4 \mu\text{g/mL}$ ),相同ST型的MG分离株对同种抗生素存在相似的敏感性(表3)。

将ST97基因型菌株YTX2和YTX5.6以及ST16基因型菌株YTX10与MG  $R_{\text{low}}$ 相关耐药基因比对分析发现,菌株YTX2、YTX5.6和YTX10的23S rRNA基因中S2段的V结构域序列一致,无碱基突变发生,表明耐药基因突

表3 MG分离株对8种抗生素的MIC测定结果

Table 3 The results of MIC determination for MG isolates against antibiotics ( $\mu\text{g/mL}$ )

| 菌株     | 金霉素               | 泰万菌素          | 泰乐菌素          | 泰妙菌素          | 沃尼妙林          | 多西环素        | 林可霉素       | 大观霉素          |
|--------|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------|------------|---------------|
| Stain  | Chlortetracycline | Tylvalosin    | Tylosin       | Tiamulin      | Valnemulin    | Doxycycline | Lincomycin | Spectinomycin |
| YTX2   | >32               | 0.5           | 4             | 0.25          | $\leq 0.0625$ | 0.5         | >32        | 8             |
| YTX5.6 | >32               | 0.5           | 8             | 0.25          | $\leq 0.0625$ | 1.0         | >32        | 16            |
| YTX9   | 16                | $\leq 0.0625$ | $\leq 0.0625$ | $\leq 0.0625$ | $\leq 0.0625$ | 1.0         | >32        | 8             |
| YTX10  | 8                 | $\leq 0.0625$ | $\leq 0.0625$ | $\leq 0.0625$ | $\leq 0.0625$ | 0.125       | 16         | 8             |
| YTX11  | >32               | 0.5           | 4             | 0.125         | $\leq 0.0625$ | 0.5         | >32        | 8             |
| YTX12  | >32               | 0.5           | 4             | 0.125         | $\leq 0.0625$ | 0.5         | >32        | 8             |
| YTX13  | >32               | 0.25          | 4             | 0.125         | $\leq 0.0625$ | 0.5         | >32        | 8             |
| YTX14  | >32               | 0.5           | 4             | 0.125         | $\leq 0.0625$ | 4.0         | >32        | 16            |
| YTX15  | >32               | 0.5           | 4             | 0.125         | $\leq 0.0625$ | 1.0         | >32        | 16            |
| ts-11  | 16                | $\leq 0.0625$ | $\leq 0.0625$ | $\leq 0.0625$ | $\leq 0.0625$ | 0.125       | 16         | 8             |

变位点并不在该序列中；而在 23S rRNA 基因中 S1 段的 V 结构域的序列比对发现菌株 YTX2 和 YTX5.6 发生 A2069G 突变，而菌株 YTX10 和对照株  $R_{low}$  序列一致(图 4A)。菌株 YTX5.6 和 YTX2 的 L4 蛋白基因出现 G568T 突变(图 4B)，在 L22 蛋白基因上出现 T102C、T129C、T252C、C336T 和 G404A 突变(图 4C)，而 YTX10 株与对照菌株  $R_{low}$  的 L4 和 L22 蛋白基因序列一致，并未发生碱基突变。

#### 2.4 MG分离株对28日龄SPF鸡的致病力分析结果

攻毒后在观察期内所有动物均未发现明显可见的呼吸道症状，并且采食与饮水未发现异常。在感染后 10、20 和 30 d 剖检发现部分感染鸡出现气囊炎，主要呈现为胸气囊浑浊增厚、有大量黄色干酪样物质渗出或有大量黄色泡沫，而阴性对照组鸡气囊则透明而薄(图 5)。其中菌株 YTX5.6 株气管攻毒组气囊炎发病率分别为 80% (4/5)、60% (3/5)和 80% (4/5)，YTX10 株气管攻毒组仅在感染后 20 d 和 30 d 出现气囊炎，发病率分别为 40% (2/5)和 20% (1/5)，其余鸡均未发现明显气囊炎。

通过对各组鸡气管进行组织病理学分析发

现，相较于点眼攻毒组以及阴性对照组，菌株 YTX5.6 和 YTX10 气管攻毒组在感染后 10、20 和 30 d 的气管黏膜增厚严重且呈显著性差异(图 6 和图 7,  $P < 0.05$ )；菌株 YTX5.6 和 YTX10 点眼攻毒组在感染后 10、20 和 30 天气管黏膜增厚情况较阴性对照组无显著差异(图 7,  $P > 0.05$ )。其中菌株 YTX5.6 气管攻毒组在感染 20 d 后气管黏膜增厚最严重，平均厚度超过 300  $\mu\text{m}$ ，而阴性对照组气管黏膜平均厚度则在 50  $\mu\text{m}$  以下(图 7)，二者存在极显著差异( $P < 0.01$ ) (图 6 和图 7)。对气管组织进行 qPCR 检测结果显示，除阴性对照组和菌株 YTX5.6 点眼攻毒组在感染 10 d 后 MG 检测为阴性外，其余鸡均呈 MG 阳性(图 8)。菌株 YTX5.6 和 YTX10 气管攻毒组在感染 10、20 和 30 d 后，气管的 MG 载量均比相应的点眼攻毒组高( $P < 0.05$ )，点眼组随着感染天数的延长 MG 的载量也逐步增高。

### 3 讨论与结论

MG 可引起家禽慢性呼吸道疾病和增重下降，在种鸡和蛋鸡中影响产蛋率和孵化率，临床症状严重程度与菌株毒力强弱相关，当与其他呼吸道病原共同感染或存在免疫抑制和不良

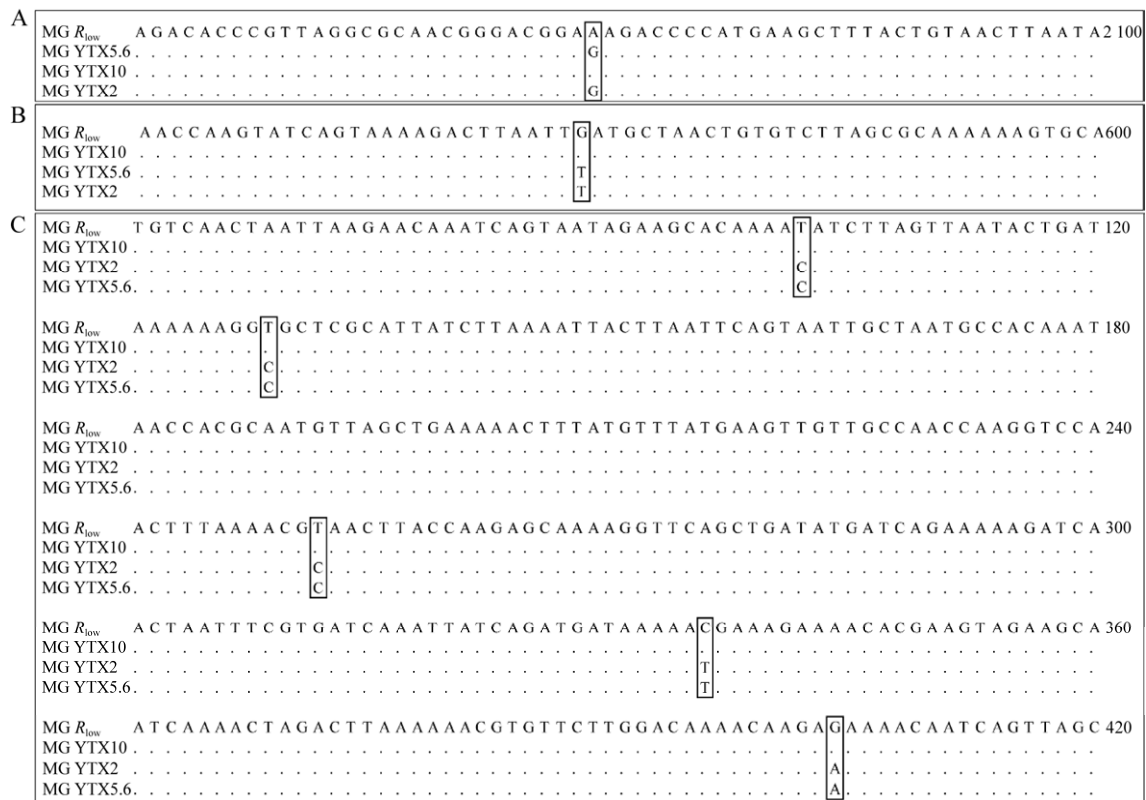


图 4 相关大环内酯类抗生素耐药基因序列分析 A: YTX10、YTX5.6、YTX2 和对照株 23S rRNA 基因 V 结构域序列比对分析. B: L4 蛋白基因序列比对分析. C: L22 蛋白基因序列比对分析

Figure 4 Sequence alignment of related resistance genes to macrolide antibiotic. A: The sequence alignment of V domain of 23S rRNA gene from YTX10, YTX5.6, YTX2 and R low strains. B: The sequence alignment of L4 protein gene. C: The sequence alignment of L22 protein gene.

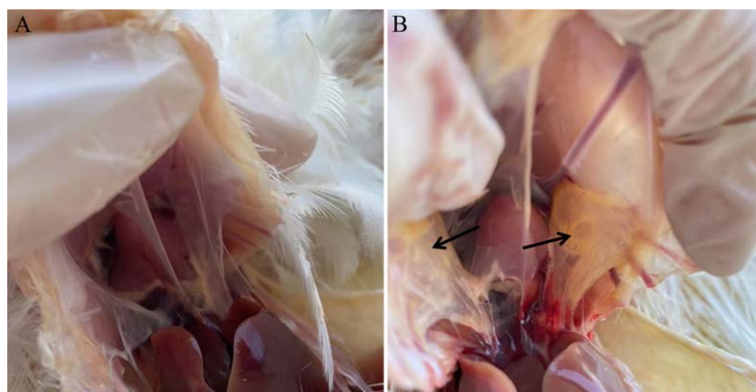


图 5 MG 分离株 YTX5.6 气管途径感染 SPF 鸡的气囊损伤 A: 对照组鸡的气囊薄而透明. B: 感染组鸡的气囊, 呈现增厚和大量黄色干酪样物质(箭头所示)

Figure 5 Air sac lesions in SPF chickens challenged by tracheal injection with MG YTX5.6 strain. A: Normal air sac is thin and transparent from no-challenged chicken. B: Air sac markedly swelling and inflamed, with a large amount of yellow cheese-like mass (arrow).

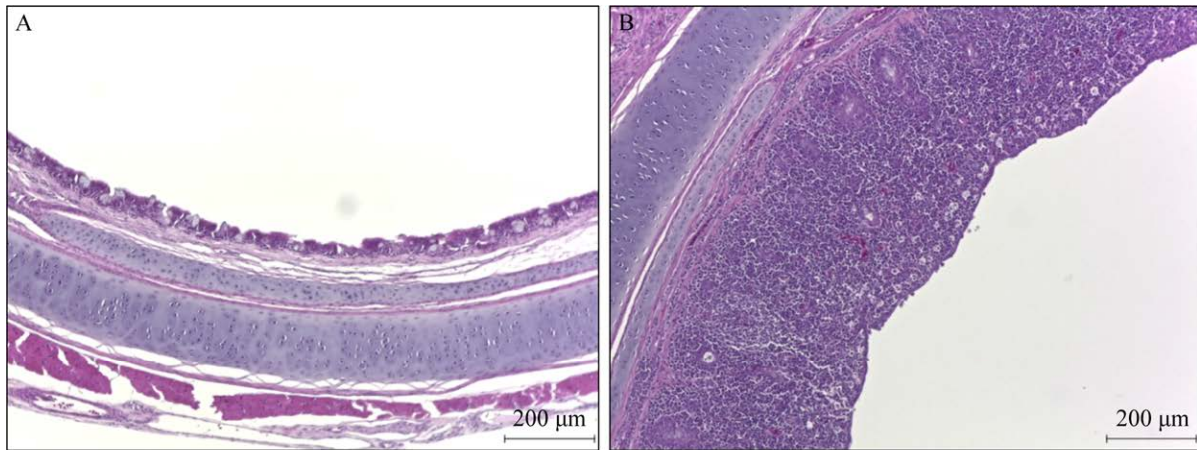


图 6 MG 分离株感染后 20 d 对照组(A)和气管攻毒组(B)的病理损伤情况

Figure 6 Pathological damage in the control group (A) and tracheal challenge group (B) after 20 days of MG isolate infection.

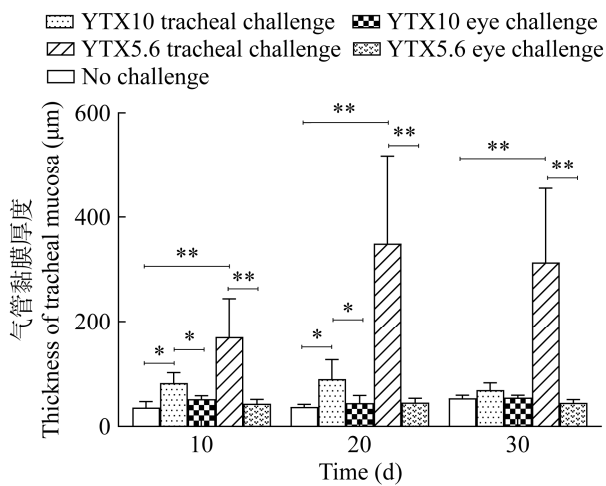


图 7 MG 分离株感染后气管黏膜厚度

Figure 7 Tracheal mucosal thickness of SPF chickens infected with MG isolates. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ .

应激可能会使该病加剧<sup>[3-4]</sup>。大环内酯类、林克酰胺类和截短侧耳类抗生素是目前兽医临床上治疗支原体感染的主要药物，但随着这些抗生素的滥用导致支原体的耐药性显著上升，并且耐药菌株对大环内酯类、林克酰胺类和截短侧耳类药物之间存在交叉耐药性<sup>[24]</sup>。临床上不同 MG 分离株之间的致病性也存在很大差异，同时不同地区菌株的耐药性也存在很大差异<sup>[25]</sup>。因

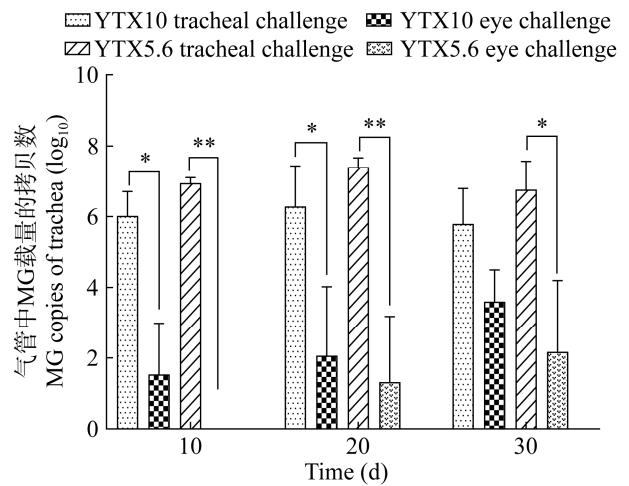


图 8 MG 分离株感染后气管中的 MG 载量

Figure 8 MG loads in the trachea of SPF chickens infected with MG isolates. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ .

此，对不同地区开展 MG 的流行情况及耐药性和致病性的调查，对高效、准确防控 MG 具有十分重要的临床意义。

本研究从山东省烟台市某规模化鸡场共分离到 9 株 MG 菌株，通过 MLST 基因分型发现 9 株 MG 分别属于基因型 ST16 和 ST97 两种 ST 型，其中在 7 株 MG 分离株中首次发现了管家基因 *plsC* 和 *mraW* 为新的等位基因，获得新的

ID号分别为33和31,与其余等位基因形成了新的基因型ST97,该基因型为国内外首次发现。ST16基因型的菌株与美国F株同源性最为接近,这可能与养殖场活疫苗的使用有关,而ST97基因型的7株分离株则为新发现的基因型,属于国内外首次发现的菌株,表明该鸡场MG感染来源复杂。

通过MIC测定发现属于ST97基因型的7个MG分离株对泰妙菌素、沃尼妙林较为敏感( $MIC \leq 0.25$ ),对泰乐菌素,金霉素,林可霉素,大观霉素则存在不同程度的耐药( $MIC \geq 4 \mu\text{g/mL}$ );ST16基因型的菌株YTX9和YTX10对金霉素、泰万菌素、泰乐菌素、泰妙菌素、沃尼妙林、多西环素、林可霉素和大观霉素共8种抗生素的敏感性与疫苗菌株ts-11结果较为一致,相同ST型的MG分离株对同种抗生素存在相似的敏感性(表3)。

Wei等<sup>[6]</sup>在我国获得的ST78基因型MG分离株对泰妙菌素耐药( $MIC: 8-128 \mu\text{g/mL}$ )而对泰乐菌素敏感,而在PubMLST数据库中聚类分析发现本研究分离的ST97型菌株与ST78型菌株属于同一组群,这表明虽然不同ST型的MG菌被分到同一组群,但其耐药性仍存在较大差异,这可能与不同地区对抗生素使用的偏好性相关。本研究相同的ST型MG分离株对同一种抗生素敏感性差异不大,而Wei等<sup>[6]</sup>分离到的Guangdong/Q3和Guangdong/3-3株均为同一个ST型(ST81),但MIC结果有较大差异,这表明即使是相同ST型的MG分离株其耐药性并不一定相似,而本研究相同的ST型MG分离株耐药谱相似可能是由于MG来源鸡群具有相似的抗生素使用方式。对相关耐药基因分析发现本研究发现的ST97分离株对大环内酯类和林克酰胺类药物产生一定程度的耐药性,在23S rRNA基因V结构域发生A2069G突变,

与Wu等<sup>[14]</sup>体外构建大环类酯类MG耐药菌株突变位点一致,但体外构建的MG泰乐菌素耐药菌株存在高耐药性( $MIC > 256 \mu\text{g/mL}$ ),高耐药菌株可能存在其他多个相关耐药点位共同作用而导致的MIC差异。王建国<sup>[17]</sup>利用大环内酯类药物体外诱导MG耐药菌株在核蛋白L4和L22基因发现了多个碱基突变,但本研究在L4和L22蛋白基因也存在多个突变位点,但二者在突变的位置上存在较大差异,这可能与MG的交叉耐药程度有关,也表明MG的耐药机制更复杂。

通过点眼和气管两种攻毒方式对28日龄SPF鸡的致病力分析发现,在相同的攻毒剂量下,气管攻毒明显比点眼攻毒发病更快,气囊损伤和气管黏膜损伤更严重,可能是MG以点眼攻毒感染需要较长时间才能在气管中达到一定滴度,而随着感染时间的增加,机体对MG产生一定程度的抗体水平,从而影响MG在气管中定殖,进而导致气管黏膜损伤没有气管攻毒组严重,这类似于在弱毒疫苗F株进行点眼免疫,在第二周就可以产生较高抗体水平<sup>[26]</sup>。YTX5.6株气管攻毒在感染10d后就能引起80%(4/5)的气囊炎发病率,感染30d后气囊炎发病率仍然很高80%(4/5),并且气管中MG的载量在整个感染过程中并未发现下降趋势,表明MG发病时间长,呈持续性感染。魏津等<sup>[27]</sup>在广东省、福建省和安徽省分离的MG菌株以气囊接种方式进行攻毒,发病率在70%–90%,与本研究YTX5.6株气管攻毒组发病率相近。本研究分离的YTX5.6株点眼攻毒组和吴春琳等<sup>[28]</sup>在白羽肉鸡中分离的MG菌株的致病水平相近,气囊均无大量黄色干酪样物质渗出,气管黏膜厚度平均值小于 $100 \mu\text{m}$ ,表明MG致病力强弱与攻毒方式和攻毒剂量有关。

此外,本研究在国内外首次发现了管家基

因 *plsC* 和 *mraW* 为新的等位基因, 获得新的 ID 号分别为 33 和 31, 并与其余等位基因形成了新的基因型 ST97, 表明我国 MG 感染来源复杂。通过对分离的菌株进行耐药性和致病性的研究, 掌握了我国烟台地区 MG 分离株的耐药情况和致病力, 为准确使用抗生素治疗或预防 MG 感染且丰富 MG 在我国的流行病学数据提供了参考和借鉴。

## REFERENCES

- [1] SPRYGIN AV, ANDREYCHUK DB, KOLOTILOV AN, VOLKOV MS, RUNINA IA, MUDRAK NS, BORISOV AV, IRZA VN, DRYGIN VV, PEREVOZCHIKOVA NA. Development of a duplex real-time TaqMan PCR assay with an internal control for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from commercial and backyard poultry[J]. Avian Pathology: Journal of the W V P A, 2010, 39(2): 99-109.
- [2] FEBERWEE A, de WIT S, DIJKMAN R. Clinical expression, epidemiology, and monitoring of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*: an update[J]. Avian Pathology: Journal of the W V P A, 2022, 51(1): 2-18.
- [3] ADEYEMI M, BWALA DG, ABOLNIK C. Comparative evaluation of the pathogenicity of *Mycoplasma gallinaceum* in chickens[J]. Avian Diseases, 2018, 62(1): 50-56.
- [4] BRADBURY JM. Avian mycoplasma infections: prototype of mixed infections with mycoplasmas, bacteria and viruses[J]. Annales De Microbiologie, 1984, 135A(1): 83-89.
- [5] 李桂喜, 何永光, 梁磊, 魏曼. 2017 年蛋鸡 19 种疫病流行病学调查报告[J]. 家禽科学, 2018(10): 39-41.  
LI GX, HE YG, LIANG L, WEI M. Epidemiological investigation report on 19 kinds of diseases of laying hens in 2017[J]. Poultry Science, 2018(10): 39-41 (in Chinese).
- [6] WEI XN, ZHONG Q, WANG DA, YAN ZQ, LIANG HZ, ZHOU QF, CHEN F. Epidemiological investigations and multilocus sequence typing of *Mycoplasma gallisepticum* collected in China[J]. Poultry Science, 2023, 102(11): 102930.
- [7] LARSEN MV, COSENTINO S, RASMUSSEN S, FRIIS C, HASMAN H, MARVIG RL, JELSBK L, SICHERITZ-PONTÉN T, USSERY DW, AARESTRUP FM, LUND O. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(4): 1355-1361.
- [8] SPRATT BG. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet[J]. Current Opinion in Microbiology, 1999, 2(3): 312-316.
- [9] JOSHI CJ, KE WF, DRANGOWSKA-WAY A, O'ROURKE EJ, LEWIS NE. What are housekeeping genes?[J]. PLoS Computational Biology, 2022, 18(7): e1010295.
- [10] GHANEM M, EL-GAZZAR M. Development of a multilocus sequence typing assay for *Mycoplasma gallisepticum*[J]. Avian Diseases, 2019, 63(4): 693-702.
- [11] NOVOTNY GW, JAKOBSEN L, ANDERSEN NM, POEHLGAARD J, DOUTHWAITE S. Ketolide antimicrobial activity persists after disruption of interactions with domain II of 23S rRNA[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(10): 3677-3683.
- [12] POEHLGAARD J, ANDERSEN NM, WARRASS R, DOUTHWAITE S. Visualizing the 16-membered ring macrolides tildipirosin and tilmicosin bound to their ribosomal site[J]. ACS Chemical Biology, 2012, 7(8): 1351-1355.
- [13] VESTER B, DOUTHWAITE S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(1): 1-12.
- [14] WU CM, WU HM, NING YB, WANG JG, DU XD, SHEN JZ. Induction of macrolide resistance in *Mycoplasma gallisepticum* *in vitro* and its resistance-related mutations within domain V of 23S rRNA[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 247(2): 199-205.
- [15] GERCHMAN I, LEVISOHN S, MIKULA I, MANSO-SILVÁN L, LYSNYANSKY I. Characterization of *in vivo*-acquired resistance to macrolides of *Mycoplasma gallisepticum* strains isolated from poultry[J]. Veterinary Research, 2011, 42(1): 90.
- [16] LI BB, SHEN JZ, CAO XY, WANG Y, DAI L, HUANG SY, WU CM. Mutations in 23S rRNA gene associated with decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin in *Mycoplasma gallisepticum*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 308(2): 144-149.
- [17] 王建国. 鸡毒支原体大环内酯类耐药性诱导及其核蛋白突变分析[D]. 北京: 中国农业大学硕士学位论文

- 文, 2006.
- WANG JG. Induction of macrolide resistance of *Mycoplasma gallisepticum* and analysis of its nucleoprotein mutation[D]. Beijing: Master's Thesis of China Agricultural University, 2006 (in Chinese).
- [18] MUGUNTHAN SP, KANNAN G, CHANDRA HM, PAITAL B. Infection, transmission, pathogenesis and vaccine development against *Mycoplasma gallisepticum*[J]. Vaccines, 2023, 11(2): 469.
- [19] LEVISOHN S, DYKSTRA MJ, LIN MY, KLEVEN SH. Comparison of *in vivo* and *in vitro* methods for pathogenicity evaluation for *Mycoplasma gallisepticum* in respiratory infection[J]. Avian Pathology: Journal of the W V P A, 1986, 15(2): 233-246.
- [20] 毕丁仁, 王桂枝. 动物霉形体及研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 127.
- BI DR, WANG GZ. Animal Mycoplasma and Research Methods[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 127 (in Chinese).
- [21] 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.
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Detection of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction (PCR): NY/T 553—2015[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2015 (in Chinese).
- [22] 罗思思, 谢芝勋, 邓显文, 谢丽基, 谢志勤, 庞耀珊, 刘加波, 范晴. 鸡毒支原体强弱毒株荧光定量 PCR 鉴别检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(8): 1206-1211.
- LUO SS, XIE ZX, DENG XW, XIE LJ, XIE ZQ, PANG YS, LIU JB, FAN Q. Development of a real-time PCR assay for differentiation of *Mycoplasma galli* septicumvirulent strains from attenuated strains[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2013, 33(8): 1206-1211 (in Chinese).
- [23] 沈青春, 李聪研, 冯倩倩, 孙晔, 宁宜宝, 朱良全, 王芳. 用半数变色单位法精确测定支原体活菌滴度[J]. 微生物学报, 2013, 53(12): 1347-1352.
- SHEN QC, LI CY, FENG QQ, SUN Y, NING YB, ZHU LQ, WANG F. Accurate titration of mycoplasma culture measured by 50% color change unit assay[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(12): 1347-1352 (in Chinese).
- [24] KLEVEN SH. Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry[J]. Avian Diseases, 2008, 52(3): 367-374.
- [25] BENCINA D, MRZEL I, BIDOVEC A, DOVC A. Characterization of *Mycoplasma gallisepticum* strains involved in respiratory disease in pheasants and peafowl[J]. The Veterinary Record, 2003, 152(8): 230-234.
- [26] EVANS JD, LEIGH SA, PURSWELL JL, JACOB R, PEEBLES ED, COLLIER SD, BRANTON SL. A comparative study of live attenuated F strain-derived *Mycoplasma gallisepticum* vaccines[J]. Avian Diseases, 2012, 56(2): 396-401.
- [27] 魏津, 王甲, 赵浩然, 刘博, 刘元杰, 姚文生, 刘燕, 马欣. 不同地区鸡毒支原体的分离鉴定及药物敏感性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(1): 368-376.
- WEI J, WANG J, ZHAO HR, LIU B, LIU YJ, YAO WS, LIU Y, MA X. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma gallisepticum* from different areas[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 50(1): 368-376 (in Chinese).
- [28] 吴春琳, 黄宝钦, 蓝天韵, 林琳, 张立根, 李健, 罗忠宝, 吴异健. 福建白羽肉鸡鸡毒支原体的分离鉴定及最小抑菌浓度测定[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(4): 1489-1497.
- WU CL, HUANG BQ, LAN TY, LIN L, ZHANG LG, LI J, LUO ZB, WU YJ. Isolation, identification and minimum inhibitory concentration determination of *Mycoplasma gallisepticum* from white-feathered broilers in Fujian[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 48(4): 1489-1497 (in Chinese).