

李俊,牛志强,侯博,等. 福建地区鸡滑液囊支原体的分离、药物敏感性及耐药株全基因组序列分析[J]. 江苏农业科学,2021,49(12):117-124.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.12.019

福建地区鸡滑液囊支原体的分离、药物敏感性及耐药株全基因组序列分析

李俊¹,牛志强²,侯博³,华利忠¹,韦艳娜¹,刘蓓蓓¹,王丽¹,谢星¹,
张珍珍¹,熊祺琰¹,邵国青¹,李新国²,冯志新¹

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所,江苏南京 210014; 2. 中牧实业股份有限公司,北京 100070;
3. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所,福建福州 350013)

摘要:2018 年自福建省疑似鸡滑液囊支原体感染病鸡中分离得到 9 株鸡滑液囊支原体,采用微量肉汤稀释法测定了对 9 种抗菌药物的敏感性,对筛选出的多重耐药株(MS HB)进行了全基因组序列分析。结果显示,福建地区鸡滑液囊支原体临床株对泰万菌素和泰妙菌素较为敏感,对泰乐菌素、多西环素、土霉素和替米考星敏感性次之,而对氟苯尼考和恩诺沙星最不敏感。多重耐药株(MS HB)基因组大小为 766 081 bp;GC 含量为 28.02%;共注释到 1 464 个基因,其中,包括多个毒力基因和 1 个耐药基因(*ermQ*),与敏感标准株 WVU1853 全基因组序列比对得出大环内酯类和氟喹诺酮类药物耐药基因的多个突变位点。研究结果丰富了对鸡滑液囊支原体流行病学的认识,并可为该地区临床治疗鸡滑液囊支原体感染的合理用药选择提供理论依据和实践指导。

关键词:鸡滑液囊支原体;药物敏感性;全基因组测序分析

中图分类号:S859.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)12-0117-07

鸡滑液囊支原体是一种无细胞壁的病原微生物,给养禽业造成严重的经济损失,可引起鸡和火鸡的关节滑膜炎、呼吸系统疾病,蛋鸡产蛋量下降、孵化率降低,肉鸡饲料转化率降低、胴体废弃率升高等不同严重程度的亚临床至临床症状,也可能与其他病原(如传染性支气管炎、新城疫病毒、流感病毒、大肠杆菌和其他支原体等)合并继发感染,或因饲养管理不善而加重病情^[1]。

临床防控鸡滑液囊支原体感染主要依靠疫苗免疫和药物治疗。疫苗免疫主要用于长期防控,而药物治疗是最快速有效降低经济损失的途径。大环内酯类、氟喹诺酮类和四环素类是临床治疗畜禽支原体感染最常用的药物类别,但是在抗菌药物长期大量使用的选择性压力下,耐药菌株相关报道屡见不鲜^[2],造成临床治疗效果下降。本研究采用微

量肉汤稀释法测定了福建地区分离的鸡滑液囊支原体对兽医临床常用抗菌药物的敏感性,得到其流行病学特征,并对多重耐药株的全基因组序列进行分析,以期临床谨慎合理选择与使用抗菌药物、遏制耐药性产生提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床病料的采集 2018 年 3—5 月对福建省不同地区疑似鸡滑液囊支原体感染病鸡采集气管拭子,置于 KM2 液体培养基中 4 ℃ 保存,送往实验室进行鸡滑液囊支原体的分离培养与鉴定。参考菌株鸡滑液囊支原体 WVU 1853 株受赠于江苏省农业科学院兽医所张小飞研究员。

1.1.2 培养基 KM2 液体与固体培养基,由江苏省农业科学院兽医研究所猪病防控研究室提供。

1.1.3 抗菌药物 牧乐兴,中牧南京动物药业有限公司产品(2 500 万 U,批号:190227001);酒石酸泰万菌素,内蒙古中牧生物药业有限公司(882 U/mg,批号:AY 201807028);酒石酸泰乐菌素,山东鲁抗舍里乐药业有限公司(939 U/mg,批号:T-1709143);延胡索酸泰妙菌素,山东胜利生物工程有限公司(80%,批号:TMP801903101);替米考星,

收稿日期:2020-10-07

基金项目:国家自然科学基金(编号:31800161、31900159);江苏省自然科学基金(编号:BK20190261、BK20180297)。

作者简介:李俊(1987—),女,安徽马鞍山人,博士,助理研究员,主要从事动物支原体耐药机制研究。E-mail:lijunjaas@126.com。

通信作者:李新国,硕士,兽医师,主要从事兽医药理研究及临床技术服务工作,E-mail:57740190@qq.com;冯志新,研究员,博士生导师,主要从事动物传染病研究,E-mail:fxjjaas@163.com。

山东鲁抗舍里乐药业有限公司(93.6%,批号:TMCZ1905044);盐酸多西环素,扬州联博药业有限公司(90.4%,批号:YD 190401108);盐酸土霉素,扬州联博药业有限公司(90.6%,批号:YT 190402054);氟苯尼考,山东国邦药业股份有限公司(100%,批号:701-1904090);恩诺沙星,浙江国邦药业有限公司(99.9%,批号:190917-5)。

1.2 方法

1.2.1 鸡滑液囊支原体的分离 病料拭子在 KM2 液体培养基中经剧烈振荡,取上清悬液经 $0.45\ \mu\text{m}$ 的滤器过滤,置于无菌的密闭培养管, $37\ ^\circ\text{C}$ 培养 18~20 h 后,以 1:10 转移接种至新鲜 KM2 液体培养基中, $37\ ^\circ\text{C}$ 继续培养 14 d,逐日观察培养基颜色变化,待颜色由玫瑰红变为橘红色或黄色时,再次以 1:10 接种新鲜培养基进行传代。待临床分离株稳定传至 3~4 代,倍比稀释后采用 KM2 固体培养基进行克隆纯化 2 次,在体视显微镜下观察菌落形态。

1.2.2 鸡滑液囊支原体的 PCR 鉴定 自 KM2 固体培养基挑取单个疑似菌落至 2 mL 的 KM2 液体培养基中,待培养成熟后,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取疑似鸡滑液囊支原体菌株的 DNA 作为模板进行 PCR 及序列测定。采用 OIE 推荐的鸡滑液囊支原体检测引物(MS-F:5'-GAGAAGCAAAA TAGTGATATCA-3', MS-R:5'-CAGTCGTCTCCG AAGTTAACAA-3'),预期扩增片段为 185 bp。具体 PCR 扩增条件参考中华人民共和国农业行业标准《禽支原体 PCR 检测方法 NY/T 553—2015》。

1.2.3 抗菌药物对鸡滑液囊支原体的最小抑菌浓度测定 参考 Hannan 推荐的微量稀释法测定抗菌药物对鸡滑液囊支原体临床分离株的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)^[3]。称取待试药物,无菌操作溶解于相应稀释液,配制母液浓度为 $1\ 280\ \mu\text{g/mL}$,将各药物母液用 KM2 液体培养基按照 2 倍稀释法稀释成 10 个工作液浓度。根据不同分离株的颜色变化单位(CCU)调整菌液接种量至 $10^4\sim 10^5\ \text{CCU/mL}$ 。在 96 孔细胞微孔板中进行 MIC 测定。设置 WVU 1853 为质控菌株, KM2 液体培养基为阴性对照,菌株培养液为阳性对照,同时各 MIC 试验设置 3 个平行。将 96 孔细胞微孔板密封后至于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中静置培养,逐日观察颜色变化,记录初始 MIC 值与终末 MIC 值。判定标准为阴性对照孔不变色,阳性对照孔变

为黄色,以试验孔不发生肉眼可见颜色变化的最低药物浓度孔为该药物对该菌株的 MIC。

1.2.4 鸡滑液囊支原体耐药株全基因组序列分析

对于呈现多重耐药表型的鸡滑液囊支原体 MS HB 株,提取其全基因组 DNA 采用 Illumina PE150 平台进行测序,具体工作交由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。简要测序步骤如下:应用 Illumina Nova Seq PE150 技术对构建的 PE 文库(~350 bp)文库测序。对于原始下机数据使用 readf(Version 10)进行过滤,得到有效数据,采用 SOAP denovo(Version 2.04)、SPAdes、ABYSS 软件进行基因组组装,并最终使用 CISA 软件进行整合,采用 gapclose(Version1.12)对初步组装结果进行优化和补洞。

使用 GeneMarkS(Version 4.17)软件对新测序的基因组进行编码基因预测,对预测基因进行 COG 功能分类、GO 注释、KEGG 通路分析。利用 tRNAscan-SE、rRNAmmer 和 Rfam database 软件对 tRNA、rRNA 和 sRNA 进行预测, IslandPath-DIOMB(Version 0.2)软件对基因岛进行预测, phiSpy 软件(Version 2.3)对前噬菌体进行预测, CRISPRdigger(Version 1.0)对 CRISPR 进行预测。使用 TCDB(Transporter Classification Database)数据库分析转运蛋白, VFDB(Virulence Factors of Pathogenic Bacteria)数据库分析毒力基因, ARDB(Antibiotic Resistance Genes Database)数据库分析耐药基因, 对比对得到的靶点突变设计引物进行 PCR, 结合桑格测序验证。

2 结果与分析

2.1 鸡滑液囊支原体的分离鉴定结果

经实验室分离纯化培养、分子生物学鉴定程序,自福建地区病鸡气管拭子样品中成功分离得到 9 株鸡滑液囊支原体,由图 1-A 可知,其 KM2 液体培养物呈紫红色,轻微振荡,有丝状或絮状物悬浮。鸡滑液囊支原体在 KM2 固体培养基上生长 7~14 d,肉眼观察可见无色、透明、细小、圆形菌落。由图 1-B 可知,体视显微镜下低倍(40×)观察可见典型“油煎蛋”状特征,光滑扁平、边缘整齐、菌落中央致密隆起。

对于平板克隆后的鸡滑液囊支原体疑似菌株,试剂盒法提取其 DNA,采用 OIE 推荐的鸡滑液囊支原体检测引物进行 PCR 扩增鉴定。由图 2 可知,测试菌株均成功扩增出特异性条带,长度为 185 bp,与

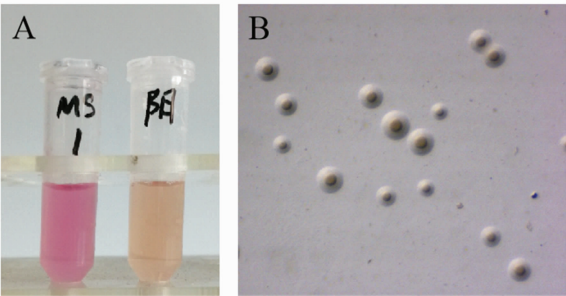
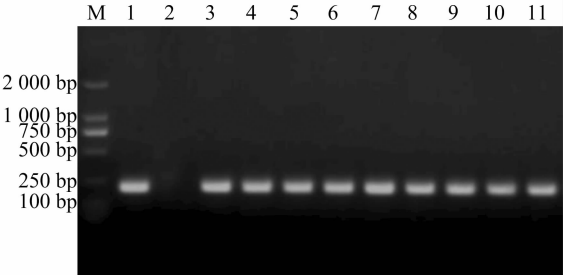


图1 鸡滑液囊支原体在液体(A)和固体(B)培养基(40×)的生长形态



M 表示 Marker；1 表示阳性对照；2 表示阴性对照；3~11 表示鸡滑液囊支原体临床分离疑似菌株
图2 鸡滑液囊支原体特异性基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

阳性对照 WVU1853 株一致,表明疑似菌株均可判定为鸡滑液囊支原体。

2.2 MIC 测定结果

鸡滑液囊支原体临床分离株(9 株)与标准株(1 株)对牧乐兴等 9 种常用抗菌药物的敏感性测定结果见表1。由表1可知,牧乐兴与泰万菌素对所

有 MS 菌株的 MIC 测定结果较为一致。多数鸡滑液囊支原体临床株对泰万菌素、泰妙菌素较为敏感,对泰乐菌素、多西环素、土霉素和替米考星敏感性次之,对氟苯尼考和恩诺沙星最不敏感。其中,多种抗菌药物对 MS HB 株的 MIC 值均较高,提示 MS HB 株可能为多重耐药支原体。

表 1 牧乐兴等 9 种抗菌药物对 10 株鸡滑液囊支原体的 MIC μg/mL

| 菌株编号 | 牧乐兴 | 泰万菌素 | 泰乐菌素 | 泰妙菌素 | 多西环素 | 土霉素 | 替米考星 | 氟苯尼考 | 恩诺沙星 |
|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|---------------|--------|
| WVU1853 | 0.060 | 0.060 | 0.030 | 0.500 | 0.125 | 0.500 | 0.125 | 8.000 | 0.500 |
| SD10 | 0.060 | 0.060 | 0.125 | 0.500 | 0.500 | 2.000 | 2.000 | 8.000 | 16.000 |
| SD19 | 0.060 | 0.060 | 0.125 | 0.500 | 0.500 | 2.000 | 1.000 | 8.000 | 16.000 |
| SD7 | 0.060 | 0.060 | 0.125 | 0.250 | 0.500 | 2.000 | 2.000 | 8.000 | 16.000 |
| SD17 | 0.060 | 0.060 | 0.125 | 0.500 | 0.500 | 1.000 | 1.000 | 8.000 | 16.000 |
| SD18 | 0.060 | 0.060 | 0.125 | 0.250 | 1.000 | 2.000 | 1.000 | 8.000 | 16.000 |
| SD12 | 0.060 | 0.060 | 0.125 | 0.500 | 0.500 | 2.000 | 2.000 | 8.000 | 16.000 |
| SD6 | 0.125 | 0.125 | 0.250 | 0.500 | 1.000 | 2.000 | 2.000 | 8.000 | 16.000 |
| H1 | 0.125 | 0.125 | 0.500 | 0.500 | 2.000 | 4.000 | 4.000 | 4.000 | 16.000 |
| HB | 2.000 | 2.000 | 8.000 | 2.000 | 0.500 | 2.000 | >128.000 | 8.000 | 16.000 |
| 不敏感菌株 MIC 应高于 | 0.500 | 0.500 | 1.000 | 8.000 | 4.000 | 4.000 | 8.000 | 2.000 | 1.250 |
| 临床株 MIC 范围 | 0.060 ~ 2.000 | 0.060 ~ 2.000 | 0.125 ~ 8.000 | 0.250 ~ 2.000 | 0.500 ~ 2.000 | 1.000 ~ 4.000 | 1.000 ~ 128.000 | 4.000 ~ 8.000 | 16.000 |
| MIC ₅₀ | 0.060 | 0.060 | 0.125 | 0.500 | 0.500 | 2.000 | 2.000 | 8.000 | 16.000 |
| MIC ₉₀ | 0.125 | 0.125 | 0.500 | 0.500 | 1.000 | 2.000 | 4.000 | 8.000 | 16.000 |

注:白色背景格为敏感 Mhr,深色背景格为不敏感 Mhr,判定标准根据参考文献[4]设置。

2.3 MS HB 株全基因组序列分析结果

将多重耐药 MS HB 株通过 Illumina PE150 平台进行全基因组测序,经序列组装和整合优化分析,其基因组基本信息见表2。由表2可知,HB 株基因组总长度为 766 081 bp,GC 含量 28.02%,N50 长度为 83 641 bp,N90 长度为 14 900 bp,最长片段为 115 534 bp,最短片段为 512 bp。由图3可知,注释后总共有 1 464 个编码基因,基因总长度为 516 525 bp,占基因组全长的 67.42%,平均长度为 353 bp。基因组含有 34 个 tRNA 编码基因,3 个 5S

表 2 MS HB 株基因组基本特征

| 类别 | 数量 |
|--------------|---------|
| 基因总长度(bp) | 766 081 |
| 基因数量 | 1 464 |
| 基因平均长度(bp) | 353 |
| 基因占基因组百分比(%) | 67.42 |
| GC 含量(%) | 28.02 |
| tRNA | 34 |
| rRNA | 5 |

rRNA ,1个16S rRNA 和1个23S rRNA 。由图4可

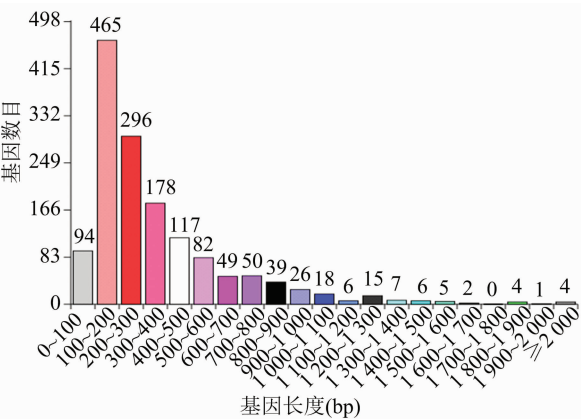


图3 MS HB 株基因长度分布

知,基因岛是与病原机理、生物体的适应性等多种生物功能相关的基因组区段,共预测到 2 个基因岛。

由图 5 可知,对预测基因进行 COG 功能分类,共有 235 个基因被分为 18 种 COG 分类;由图 6 可知,共有 2 875 个基因注释上 42 条 GO 功能分类,样本基因的功能在生理过程分类中主要聚集于细胞进程(413 个)和代谢过程(405 个);在分子功能主要聚集于结合(341 个)和催化活性(373 个)。由图 7 可知,对基因进行 KEGG 注释,561 个基因共注释上 90 个通路,最多见的 4 个注释通路分别是代谢通路(89 个)、核糖体(43 个)、次级代谢产物生物合成

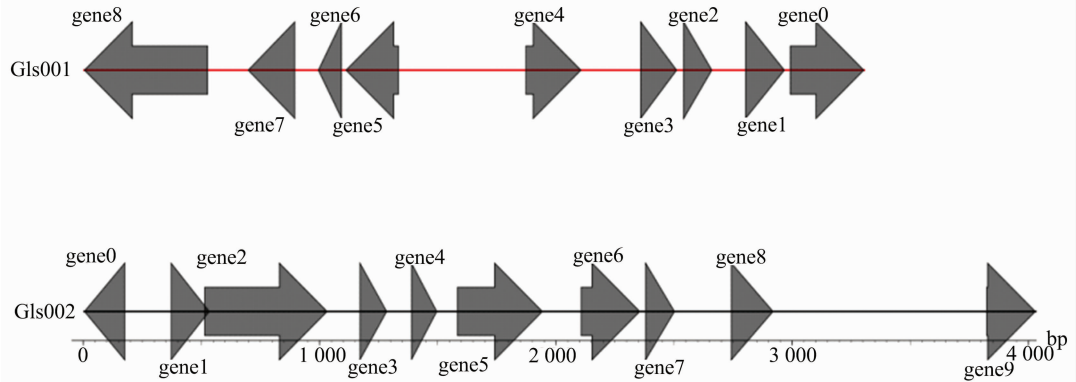


图4 MS HB 株基因岛中的基因分布

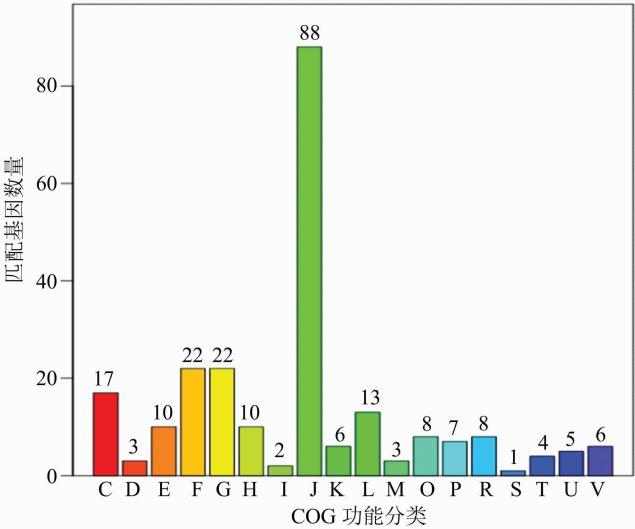


图5 MS HB 株基因组 COG 功能注释结果

- C: 能量产生与转化 (17)
- D: 细胞循环控制, 细胞分裂, 染色体分裂 (3)
- E: 氨基酸转运与代谢 (10)
- F: 核苷酸转运与代谢 (22)
- G: 碳水化合物转运与代谢 (22)
- H: 辅酶转运与代谢 (10)
- I: 脂质转运与代谢 (2)
- J: 翻译, 核糖体结构与合成 (88)
- K: 转录 (6)
- L: 复制, 重组与修复 (13)
- M: 细胞壁/细胞膜合成 (3)
- O: 转录后修饰, 蛋白折叠, 伴侣分子 (8)
- P: 无机粒子转运与代谢 (7)
- R: 基础功能预测 (8)
- S: 未知功能 (1)
- T: 信号转导机制 (4)
- U: 胞内转运, 分泌与囊泡转运 (5)
- V: 防御制剂 (6)

(27 个)和多样环境中的微生物代谢(27 个)。

通过与细菌致病毒力因子数据库 (VFDB) 比对,MS HB 株基因组共注释到 9 个毒力相关基因,主要包括 *dnaK*、*cylA*、*EF - Tu*、*lplA1*、*SSU98*、*oppF*、*pdhB*、*vlh* 和 *GAPDH* 等,具体注释见表 3。

通过 ARDB 数据库注释,MS HB 株基因组中注释到 1 个耐药基因 *ermQ*,该耐药基因的基因序列编

号为:GM000161。将 MS HB 株的大环内酯类耐药基因:23S rRNA 基因(*rrlA* 和 *rrlB*)、L4 核糖体蛋白编码基因(*rplD*)、L22 核糖体蛋白编码基因(*rplV*)以及氟喹诺酮类药物靶点:DNA 旋转酶编码基因(*gyrA* 和 *gyrB*)和拓扑异构酶 IV 编码基因(*parC* 和 *parE*)与 GenBank 中已公布全基因组序列的 MS WVU1853 株(登录号:NZ CP011096)进行比对,获

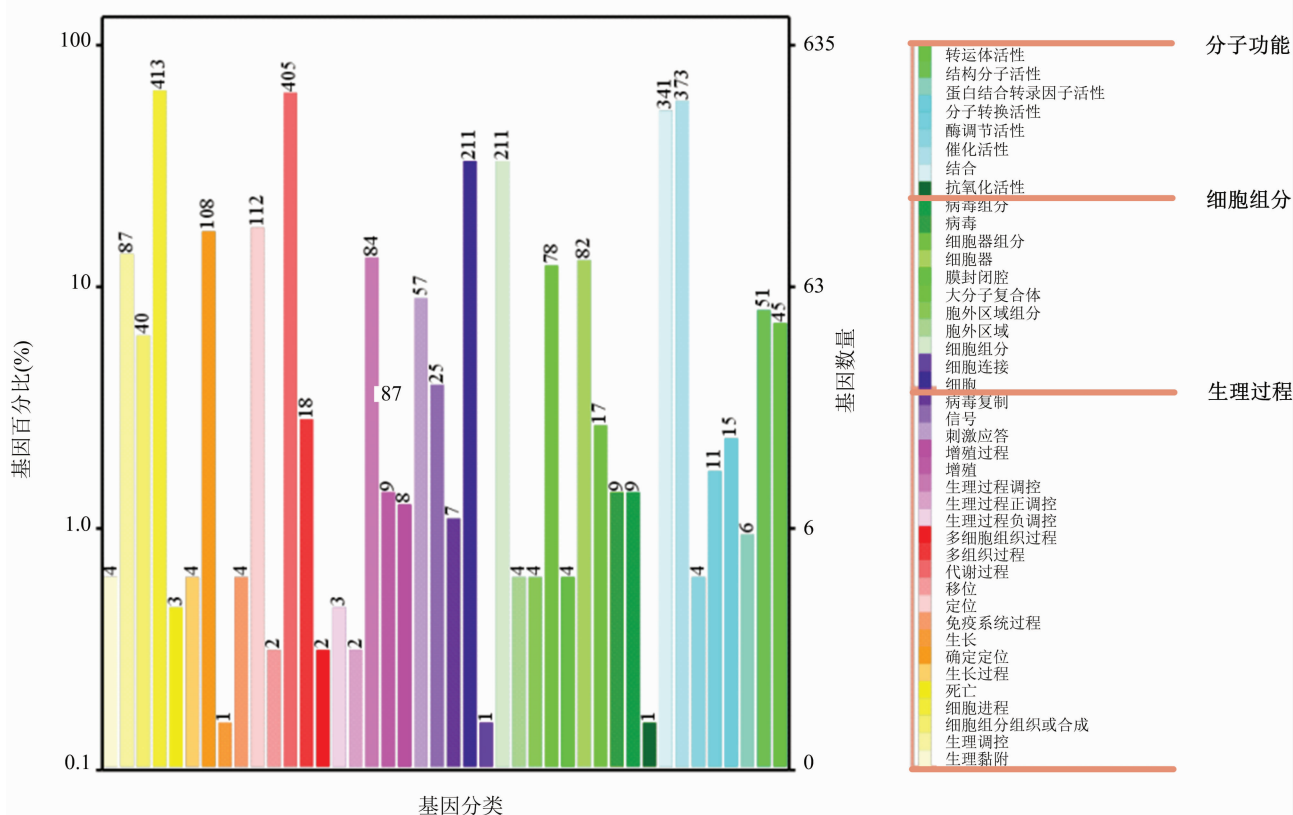


图6 MS HB 株基因组 GO 功能注释结果

得其基因突变位点与相应氨基酸突变位点,由表 4 可知,这些基因突变可能导致药物作用靶位改变,与抗生素亲和力下降,从而引起耐药。

3 讨论

支原体缺乏细胞壁结构,作用于细胞壁的 β -内酰胺类药物对其无效,而作用于蛋白质合成和 DNA 复制环节的大环内酯类、四环素类和氟喹诺酮类药物抗支原体效果较强^[5]。本研究结果发现,福建地区分离的鸡滑液囊支原体临床株对大环内酯类药物(泰万菌素、泰乐菌素和替米考星)、截短侧耳素类(泰妙菌素)和四环素类(多西环素和土霉素)较为敏感,而抗菌药物氟苯尼考和恩诺沙星由于在兽医临床的广泛应用,鸡滑液囊支原体临床株对其敏感性降低,与国内相关调查数据较为一致。

丁美娟等 2012—2014 年测定自河南、江苏、安徽、河北和广东 5 省分离得到的鸡滑液囊支原体代表株药物敏感性,发现其对泰乐菌素较为敏感,对氟喹诺酮类药物具有不同程度的抗药性^[6]。2015—2017 年招丽婵等分析了广东、广西、江苏、浙江、福建等地 10 个不同地区鸡滑液囊支原体代表

株,发现其均对泰妙菌素、泰万菌素、泰乐菌素和多西环素较为敏感,而对金霉素、庆大霉素等敏感性下降,甚至出现不同程度耐受性,对盐酸环丙沙星、沙拉沙星敏感性较低^[7]。石晓磊等 2017 年初从宁夏地区采集 87 份疑似感染鸡病料,分离得到 13 株鸡滑液囊支原体,每个分离地随机挑选 1 株进行药敏试验,发现 3 株滑液囊支原体均对泰万菌素、泰妙菌素、泰乐菌素敏感,而对氟苯尼考和恩诺沙星有一定的耐受性^[8]。Kreizinger 等 2002—2016 年自欧洲中部和东部 7 个国家采集到 41 株鸡滑液囊支原体,发现四环素类(多西环素、土霉素和金霉素)、大环内酯类(泰万菌素、泰乐菌素和替米考星)、截短侧耳素类(泰妙菌素和沃尼妙林)以及盐酸林可大观对其具有体外抑菌效果,而氟喹诺酮类(恩诺沙星、双氟沙星),新霉素,壮观霉素,林可霉素和氟苯尼考的 MIC 值较高^[9]。

本研究应用 Illumina Nova Seq PE150 技术对多重耐药株(MS HB)进行全基因组序列分析,破解其耐药与毒力相关因子遗传信息。通过与 VFDB 数据库比对,挖掘到 MS HB 基因组中存在多个毒力相关因子,包括 *dnaK*、*cylA*、*EF-Tu*、*lplA1*、*SSU98*、*oppF*、*pdhB*、*vlh* 和 *GAPDH* 等。与其他支原体相同,如牛

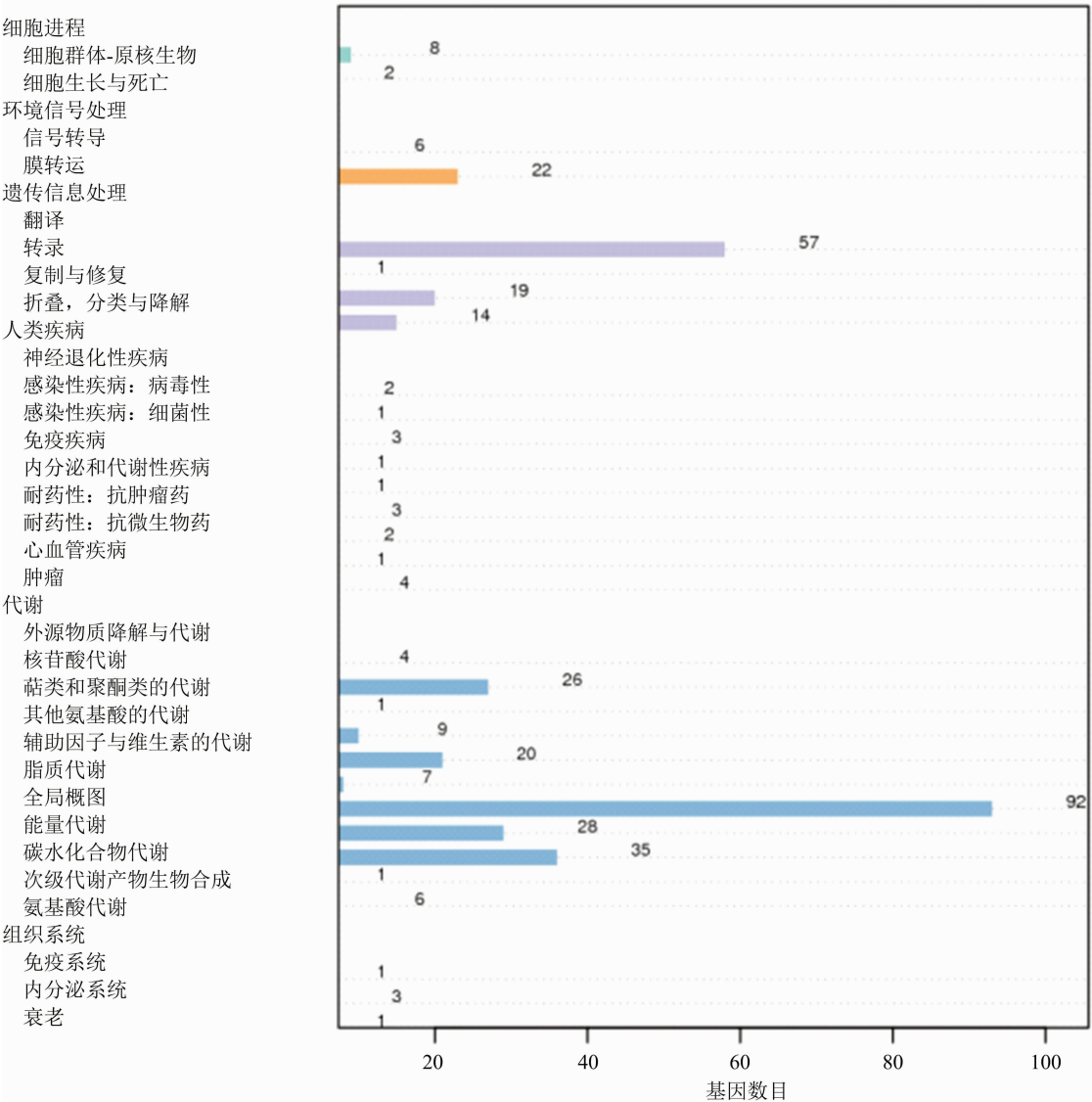


图7 MS HB 株基因组 KEGG 功能注释结果

表 3 MS HB 株基因组 VFDB 数据库注释结果

| 基因编号 | E - value | 毒力因子名称 | 相关基因或蛋白 |
|----------|-------------------------|-----------------|-------------------------------|
| GM000183 | 2.90×10^{-94} | MOMP | CT396 分子伴侣 DnaK |
| GM000560 | 4.50×10^{-30} | Beta - 溶血素/溶细胞素 | clyA ABC ATP - 结合盒转运体 CylA |
| GM000583 | 1.10×10^{-225} | EF - Tu | Tuf 延伸因子 Tu |
| GM000824 | 7.60×10^{-46} | 脂蛋白连接酶 A1 | lplA1 假定蛋白 |
| GM001022 | 1.10×10^{-66} | 纤连蛋白结合蛋白 | SSU98 - 1513 磷酸丙酮酸水合酶 |
| GM001204 | 1.60×10^{-86} | 荚膜 | oppF 寡肽 ABC 转运体, 通透酶组分 |
| GM001355 | 2.90×10^{-184} | PDH - B | pdhB 丙酮酸脱氢酶 E1 组分, β 亚基 |
| GM001418 | 6.10×10^{-99} | Vlh/pMGA | Vlh Vlh. 1. 06 |
| GM001457 | 4.20×10^{-59} | GAPDH | MG - 301 甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶 |

支原体^[10]、鸡毒支原体^[11]、猪肺炎支原体^[12-13]等, 这些毒力相关因子可参与支原体感染宿主细胞、逃避免疫并引起宿主免疫病理反应, 在支原体动物体内定殖和存活中起着重要作用^[14]。

通过与 ARDB 数据库进行比对, 分析得到 MS HB 株基因组中存在大环内酯类抗性基因 *ermQ*, 该基因最早在产期荚膜梭菌中发现, 可介导对大环内酯类 - 林可霉素 - 链阳菌素 B (MLS) 耐药^[15]。

表 4 MS HB 株大环内酯类和氟喹诺酮类耐药基因的突变位点与相应氨基酸突变位点

| 药物种类 | 耐药基因 | 基因突变位点 | 氨基酸突变位点 |
|-------|-------------|--------|---------|
| 大环内酯类 | <i>rrlA</i> | T760C | — |
| | | T864C | |
| | | T1322C | |
| | | G2613A | |
| | <i>rrlB</i> | T864C | — |
| | | A2213G | |
| | <i>rplD</i> | C64A | Q22K |
| | | T76G | S26A |
| | | A196G | S66G |
| | | A476G | N107S |
| | | A644G | N163S |
| | <i>rplV</i> | 无 | 无 |
| 氟喹诺酮类 | <i>gyrA</i> | G47A | G16D |
| | | C892G | L298V |
| | | C1320T | A440V |
| | | C2390T | T643I |
| | <i>gyrB</i> | T704G | N147T |
| | | C1711A | D343Y |
| | <i>parC</i> | C254T | T85I |
| | | A1025G | N243S |
| | | A1243G | I316V |
| | | G1354A | E353K |
| | | A1858C | K440Q |
| | | T2120C | V527A |
| | | A2278G | T580A |
| | | T2435A | I632K |
| | | G2569A | E677K |
| | <i>parE</i> | T4C | S2P |
| | | A118G | I40V |
| | | C472T | P158S |
| | | G1383C | E219D |

ermQ 基因作用机制主要为编码甲基化酶,使核糖体 23S rRNA 基因甲基化,导致 MLS 失去对鸡滑液囊支原体的抑制作用。本研究首次报道在鸡滑液囊支原体基因组中检测到 *ermQ* 抗性基因。支原体对大环内酯类药物最重要的耐药机制是核糖体上 23S rRNA 结构域Ⅱ区和 V 区靶点突变^[16]。鸡滑液囊支原体基因组中包含 2 个 *rrn* 操纵子,每个操纵子具有 1 个 23S rRNA 基因。研究报道 23S rRNA 基因Ⅱ区突变位点较少,目前仅有 G748A 报道^[17],与其他支原体类似。Inna Lysnyansky 和 Katinka Beko 等发现,鸡滑液囊支原体 23S rRNA 基因Ⅳ区最常见的

靶点突变为 G2057A、A2058G 和 A2059G^[4,17]。本研究中鸡滑液囊支原体临床株 (MS HB 株) 对大环内酯类抗生素 (泰万菌素、泰乐菌素和替米考星) 呈现高度耐药特征,但通过比对并未在这些常见位点检测到突变,推测其对大环内酯类主要耐药机制可能由 *ermQ* 所介导。恩诺沙星对 MS HB 株的 MIC 值与敏感标准株 WVU1853 相比,升高 32 倍。比较两者氟喹诺酮类靶酶编码基因 (*gyrA*、*gyrB*、*parC* 和 *parE*),发现多个突变位点,可能与其耐药性相关,但需要进一步验证,其中 ParC 蛋白的 T85I 位点突变在近期文献^[4]中亦有报道。

目前,抗菌药物治疗仍是国内临床防控鸡滑液囊支原体感染最有效的方法。根据本研究结果,防治鸡滑液囊支原体感染,可首选泰万菌素和泰妙菌素;而针对鸡滑液囊支原体与其他细菌性疾病的混合感染,可考虑与多西环素、氟苯尼考等抗菌药物联合用药进行防控。支原体虽然生长缓慢,培养条件苛刻,但其临床分离鉴定与长期耐药性检测具有重要临床意义,应结合药敏试验审慎合理选择敏感药物进行治疗。未来也可针对其耐药机制建立耐药突变位点的分子生物学快速检测方法,达到预测耐药性的目的,可缩短支原体培养与药敏实验时间,亦可为临床治疗鸡滑液囊支原体感染的合理用药选择提供理论依据和实践指导。

参考文献:

[1] 李书光,苗立中,程立坤,等. 滑液囊支原体研究进展[J]. 动物医学进展,2020,41(5):116-120.

[2] Gautier - Bouchardon A V. Antimicrobial resistance in *Mycoplasma* spp. [J]. Microbiology Spectrum,2018,6(4):.

[3] Hannan PCT. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species[J]. Veterinary Research,2000,31:373-395.

[4] Bekö K, Kreizinger Z, Kovács Á B, et al. Mutations potentially associated with decreased susceptibility to fluoroquinolones, macrolides and lincomycin in *Mycoplasma synoviae*[J]. Veterinary Microbiology,2020,248:108818.

[5] 孔意端,林居纯,陈继荣,等. 鸡毒支原体不同地区分离株对常用抗菌药物的敏感性试验[J]. 动物医学进展,2008,29(6):35-38.

[6] 丁美娟,卢凤英,严 鹏,等. 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[J]. 中国兽药杂志,2015,49(10):52-55.

[7] 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.

[8] 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

谭东海,雷小文,刘珍妮,等. 2 种饲养模式对番鸭生长和屠宰性能、肉品质的影响[J]. 江苏农业科学,2021,49(12):124-128.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.12.020

2 种饲养模式对番鸭生长和屠宰性能、肉品质的影响

谭东海¹, 雷小文¹, 刘珍妮¹, 钟云平¹, 谢华亮¹, 孔智伟¹, 陈荣强¹, 吴辉生²

(1. 赣州市畜牧研究所/赣南科学院,江西赣州 341000; 2. 赣州市职业技术学院,江西赣州 341100)

摘要:为探讨不同饲养模式对番鸭生长性能、屠宰性能和肉品质的影响,选用 14 日龄公番鸭 360 羽,随机分成 2 组,分别为网上平养组(W_p组)和网上垫料组(W_d组),每组 6 个重复,每个重复 30 羽。在不同饲养模式下,分别测定了各组的生长性能、屠宰性能及胸肌品质。结果表明:(1)W_d组的体质量、平均日增质量、平均日采食量和饲料转化率均高于 W_p组,但差异不显著($P>0.05$);(2)W_d组的心脏指数、肌胃指数和十二指肠厚度均高于 W_p组,但差异不显著($P>0.05$);(3)W_p组的鲜味氨基酸总量、必需氨基酸总量及 18 种氨基酸总量均显著或极显著高于 W_d组($P>0.05$ 或 $P>0.01$)。由此可见,与网上平养饲养模式相比,网上垫料平养饲养模式不影响番鸭的生长性能和屠宰性能,但对肉质中氨基酸含量有一定的负面影响。

关键词:饲养模式;番鸭;生长性能;屠宰性能;肉品质

中图分类号: S831.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)12-0124-05

番鸭原产于南美洲,是一种优质的肉用鸭品种,具有较高的瘦肉率和突出的肉质风味特征,受到越来越多消费者和养殖户的青睐^[1]。近年来,网床饲养逐步成为肉鸭养殖的一项主要技术。根据对粪污处理方式的不同,网床饲养又分为网上平养模式和网上发酵床平养模式^[2]。网上平养模式的

特点是能有效减少动物与粪便接触的机会,对于防疫、动物机体健康及羽毛质量大有益处^[3-4]。但网上平养模式也存在一定弊端,一方面,网垫与番鸭的直接接触容易影响鸭腿部和脚垫的健康;另一方面,网上平养模式加大了粪污清理和处理的难度,且在造成环境污染的同时增加了处理成本。网上发酵床平养模式可以通过微生物菌群发酵、分解和转化鸭粪便中的有机质,保护肉鸭脚垫和腿部健康^[5],但需要专业技术人员维护菌种,增加了技术难度和养殖成本。鉴于此,本研究尝试一种全新的番鸭养殖模式——网上垫料平养模式。该模式通过将垫料置于网床上,做到粪尿分离,不仅能够有效减少番鸭粪便处理成本,也能保持垫料干燥从而

收稿日期:2020-10-12

基金项目:江西省现代农业水禽产业技术体系项目(编号:JXARS-09);江西省赣州市科技计划(编号:赣市财教字[2017]179号)。

作者简介:谭东海(1986—),男,江西于都人,硕士,畜牧兽医师,主要从事家禽健康养殖研究。E-mail:1378907729@qq.com。

通信作者:雷小文,硕士,高级畜牧兽医师,从事动物营养与动物疫病研究。E-mail:343224896@qq.com。

定与药敏试验[J]. 动物医学进展,2018,39(11):134-136.

[9] Kreizinger Z, Gróznér D, Sulyok K M, et al. Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma synoviae* strains originating from Central and Eastern Europe[J]. BMC Veterinary Research, 2017, 13(1):342.

[10] Bürki S, Frey J, Pilo P. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 179(1/2):15-22.

[11] Ishfaq M, Hu W, Khan M Z, et al. Current status of vaccine research, development, and challenges of vaccines for *Mycoplasma gallisepticum*[J]. Poultry Science, 2020, 99(9):4195-4202.

[12] 宁雅茹,丁红雷. 猪肺炎支原体与宿主相互作用研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, 36(9):1741-1753.

[13] 郭芸芸,张雪寒,刘茂军,等. 猪肺炎支原体纤毛黏附因子 P97 和 F7-CTB 对 O 型口蹄疫灭活疫苗的免疫增强作用[J]. 江苏

农业科学, 2019, 47(11):204-210.

[14] Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells [J]. Physiological Reviews, 2003, 83(2):417-432.

[15] Berryman D, Lyristis M, Rood J I. Cloning and sequence analysis of ermQ, the predominant macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene in *Clostridium perfringens*[J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 1994, 38(5):1041-1046.

[16] Miyashita N, Kawai Y, Akaike H, et al. Macrolide-resistant mycoplasma pneumoniae in adolescents with community-acquired pneumonia[J]. BMC Infectious Diseases, 2012, 12:126.

[17] Lysnyansky I, Gerchman I, Flaminio B, et al. Decreased susceptibility to Macrolide-Lincosamide in *Mycoplasma synoviae* is associated with mutations in 23S ribosomal RNA [J]. Microbial Drug Resistance, 2015, 21(6):581-589.