



研究报告

滑液囊支原体不同感染途径的致病力比较

侯博^{*1} 王晨燕^{*1} 邵国青^{1,2}

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 江苏省农业科学院兽医研究所 江苏 南京 210014

摘要:【背景】自 2010 年以来,我国鸡群中滑液囊支原体(*Mycoplasma synoviae*, MS)的感染率不断增高,目前 MS 已广泛存在于我国不同的鸡群中,包括蛋鸡、种鸡、白羽肉鸡和地方品种鸡等,其血清阳性率已超过 40%,严重危害我国养鸡业,并造成了严重的经济损失。【目的】系统比较 MS 以不同感染途径对 56 日龄无特定病原体(Specific Pathogen Free, SPF)鸡的致病力。【方法】采用 MS 强毒 FZ 株以点眼、爪垫注射、胸部皮下注射、单次气管注射、连续 3 次气管注射等不同途径感染 56 日龄 SPF 鸡,观察感染后临床症状和解剖病理变化,检测感染后血清中的 MS 抗体,并且对气管组织进行病原再分离和组织病理学观察。【结果】MS 的 FZ 株以不同途径感染 SPF 鸡后临床表现和发病率差异较大,爪垫注射和胸部皮下注射可导致 100%的鸡发生爪垫肿大或胸部囊肿,而单次或连续 3 次气管注射可引起 33%–50%的鸡发生严重气囊炎,点眼感染途径基本不能引起临床病理变化;爪垫肿大主要为肉芽组织增生和出现大量的黄色干酪样块状物质,胸部囊肿在囊肿部位有大量的血红色样液体和黄色干酪样块状物质;组织病理学结果显示连续 3 次气管注射方式感染更易对气管造成损伤,表现为气管黏膜固有层/黏膜下层发生轻微至轻度灶性炎细胞浸润,而爪垫肿大和胸部囊肿组织有大量的纤维组织和血管增生,同时伴有大量炎性细胞浸润;点眼和气管注射途径的气管 MS 病原再分离率可达 100%,而胸部皮下注射或脚垫注射也可从气管中分离到 MS 病原;爪垫注射途径更易引起 MS 抗体转阳。【结论】系统比较了 MS 以不同感染途径对 56 日龄 SPF 鸡的致病性,并筛选出了相应的评价指征,成功建立了 MS 人工感染 8 周龄 SPF 鸡的发病模型,其中点眼感染途径和气管注射途径以气管病原再分离作为主要指征,辅以气囊炎进行评价,而胸部皮下注射和爪垫注射途径分别以胸部囊肿和爪垫肿胀作为主要病理指征进行评价。

关键词: 滑液囊支原体, 致病力, 感染模型, 不同感染途径

*Corresponding authors: Tel: 86-591-87572001

E-mail: HOU Bo: houbohouwei@126.com; WANG Chenyan: 15396022617@163.com

Received: 16-03-2021; Accepted: 01-04-2021; Published online: 28-04-2021

*通信作者: Tel: 0591-87572001

E-mail: 侯博: houbohouwei@126.com; 王晨燕: 15396022617@163.com

收稿日期: 2021-03-16; 接受日期: 2021-04-01; 网络首发日期: 2021-04-28

Comparison of pathogenicity to *Mycoplasma synoviae* with different infection routs

HOU Bo^{*1} WANG Chenyan^{*1} SHAO Guoqing^{1,2}

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

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

Abstract: [Background] The infection rate of *Mycoplasma synoviae* (MS) in chicken flocks has been increasing in China since 2010, and MS has been widely present in different flocks, including laying hens and/or breeders, white feather broilers and local breeds. The positive rate of MS antibody has exceeded 40%, which has seriously harmed Chinese chicken industry and caused serious economic losses. **[Objective]** The pathogenicity of MS to 56-day-old specific pathogen free (SPF) chickens with different infection routes was simultaneously compared. **[Methods]** The MS virulent FZ strain was used to infect 56-day-old SPF chickens by eye dropping, footpad injection, chest subcutaneous injection, single tracheal injection, and three consecutive tracheal injections. The clinical symptoms and anatomical pathological changes were observed from infection chickens, and MS antibody, re-isolation of pathogens from the trachea, and histopathological was determined at post-infection. **[Results]** The chicken infected MS FZ strain with different routes had different clinical symptoms and different morbidity. Footpad injection and chest subcutaneous injection could cause 100% of chickens exhibiting footpad swelling or chest cyst, while a single or three consecutive tracheal injection could cause 33%–50% of chickens exhibiting severe air sacculitis, the eye dropping infection had hardly caused clinical pathological changes; The footpad swelling showed proliferation of granulation tissue and a large amount of yellow cheese-like mass, and some blood-red liquid and yellow cheese-like mass were found in the chest cyst; Histopathological results showed that three consecutive tracheal injection were more likely to cause damage to the trachea, manifested mild inflammatory cell infiltration in the lamina propria/submucosa of the trachea, footpad swelling and chest cyst tissue had a lot of fibers tissue and blood vessel hyperplasia, accompanied by a large number of inflammatory cell infiltration. It was found that MS re-isolation from tracheal of birds challenged by eye dropping and tracheal injection could reach to 100%, and the MS were also isolated from the trachea by chest subcutaneous or footpad injection. MS antibody was easier to be detected from chickens challenged by footpads. **[Conclusion]** The pathogenicity of MS to SPF chickens with different infection routes was systematically compared, then the typical pathological lesions or virulence evaluation methods were presented after MS artificial infection, and a model of MS artificial infection to 56-day-old SPF chickens was successfully established. It is found that MS re-isolation from trachea was main indication for eye dropping and tracheal injection, and air sacculitis was auxiliary. In addition, footpad swelling or chest cyst was cardinal symptom to footpad and chest subcutaneous injection, respectively.

Keywords: *Mycoplasma synoviae*, pathogenicity, infection model, different infection routs

滑液囊支原体(*Mycoplasma synoviae*, MS)感染引起鸡和火鸡传染性滑膜炎、腱鞘炎及呼吸道症状,广泛存在于世界各地。自2010年以来,我国鸡群中MS的感染率不断增高,在2010–2015年对我国21省的44395只非免疫鸡通过酶联免疫吸附法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)检测发现MS能够感染任何年龄的鸡,总

体流行率为41.19%,血清阳性率在不同年份从24.7%到57.20%不等^[1]。2010–2015年我国16个省超过9773个肉鸡群感染了MS,其中MS在多日龄混养的我国本土种鸡中广泛流行,在种鸡鸡胚中感染率高达16.29%^[2]。2018年对宁夏石嘴山、银川、吴忠、中卫、固原5个地区鸡MS感染情况的调查中发现,MS抗体总阳性率为67.18%,

各地区抗体阳性率为 46.23%–89.67%^[3]。因此,目前 MS 已广泛存在于我国不同种类的鸡群中,包括蛋鸡或种鸡、白羽肉鸡和黄鸡等。

在感染过程中,不同 MS 菌株对不同组织具有不同的嗜性^[4],从滑液囊分离的 MS 更易引起滑液囊炎,致使关节肿胀、跛行、站立困难^[5];输卵管型菌株引起蛋壳尖端异常(Eggshell Apex Abnormalities, EAA),使产蛋鸡产蛋量下降、蛋壳质量下降、蛋破损率上升,在种鸡中感染 MS,则商品鸡的孵化率降低^[6];呼吸型菌株主要造成亚临床的呼吸道疾病^[5]。因此,MS 是目前危害养鸡业最严重的细菌病原体之一。

本研究采用分离自上呼吸道的 MS FZ 株,以点眼、气管注射、爪垫注射、胸部皮下注射等不同途径感染 56 日龄无特定病原体(Specific Pathogen Free, SPF)鸡,通过临床症状和解剖病理变化观察、气管病原再分离、气管等组织病理损伤观察、感染后 MS 抗体检测比较 MS 不同感染途径对 SPF 鸡的感染能力和致病力,筛选 MS 人工感染后典型病理指征或致病力评价方法,建立 MS 人工感染 56 日龄 SPF 鸡的发病模型,以期为临床认识、诊断和有效防控 MS 在鸡群中的感染提供方法或依据。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料

MS 的 FZ 分离株由福建省农业科学院畜牧兽医研究所保存;KM2 支原体液体培养基由江苏省农业科学院兽医研究所提供;SPF 种蛋,济南斯帕法斯家禽有限公司;SPF 鸡饲料,北京科澳协力饲料有限公司;Mycoplasma synoviae Antibody Test Kit, BioChek 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。

1.2 MS 攻毒菌液的准备和半数颜色变化单位(Color Change Units 50, CCU₅₀)测定

将保存的 P1 代菌种以 1:1 000 接种新鲜 KM2

液体培养基,37 °C 静置培养 1–3 d,待培养基颜色变为橙色或橙黄色时以不同途径进行人工感染试验,每羽鸡 0.2 mL,同时测定 CCU₅₀。操作:取 0.5 mL 培养物加入到 4.5 mL KM2 培养基中,依次倍比稀释到 10⁻¹⁰,每个稀释度的菌液分别移至 4 支不同的培养管中,每支 1 mL,同时用无菌新鲜培养基设阴性对照,放入 37 °C 培养箱中,5–10 d 观察结果,当阴性对照培养基颜色不变色(玫瑰红色),而稀释菌液变色(变为黄色或橘黄色)则为支原体生长,记为阳性,按照 Reed-Muench 法计算攻毒菌株的 CCU₅₀/mL。

1.3 SPF 鸡分组及人工感染试验安排

SPF 种蛋自行孵化,选取外观健康、初始体重接近的 0 日龄出壳雏鸡放入 SPF 鸡隔离器中饲养 56 日龄后,将 72 羽鸡随机分为 6 组,其中 G1 组点眼、G2 组气管注射、G3 组左爪爪垫注射、G4 组胸部皮下注射、G5 组在 1、3、5 d 以连续气管注射 3 次的方式分别对 5 组鸡进行人工感染,G6 组的所有鸡用新鲜无菌培养基同时进行点眼、气管注射、胸部皮下注射、爪垫注射作为阴性对照。

1.4 感染后临床症状和大体解剖病理观察

攻毒后对攻毒组、阴性对照组的鸡每日进行临床观察 2 次,主要观察是否出现咳嗽、张口呼吸等呼吸道症状,以及胸部囊肿和爪垫肿胀程度。在攻毒后 10 d 和 20 d 每组随机各取 6 羽鸡采集血液将动物处死进行解剖,观察气囊炎、爪垫肿胀、胸部囊肿等发生情况并评分;另采集气管的下 1/2 段冻存于 -70 °C,用于 MS 再分离,气管的上 1/2 段和肿胀爪垫、胸部囊肿组织固定在 10% 福尔马林中,进行组织病理学分析。

1.5 组织病理损伤观察

采集的病理组织经 10% 福尔马林固定后,逐级酒精脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,常规苏木精-伊红染色法(Hematoxylin-Eosin Staining, HE)染色,光镜下观察组织病理学损伤情况。所有组

织形态学改变根据轻重进行评分, 轻微、轻度、中度、重度分别评为 1–4 分, 无病变记为 0 分。

1.6 感染后气管 MS 病原再分离

将采集的气管加入 KM2 液体培养基 3 mL 后进行充分振荡, 经 0.45 μm 滤器过滤后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 14 d, 逐日观察培养基颜色变化, 颜色由玫瑰红变为橘红色或黄色时, 对发生颜色变化的培养物按照中华人民共和国行业标准 NY/T 553-2015 禽支原体 PCR 检测方法进行鉴定, 即以 MS 特异性引物对 MS-F (5'-GAGAAGCAAAATAGTGATATCA-3') 和 MS-R (5'-CAGTCGTCTCCGAAGTTAACAA-3') 进行 PCR 鉴定。

1.7 感染后 MS 抗体测定

将动物处死前采集的血液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 3–4 h, 然后 2–8 $^{\circ}\text{C}$ 放置 4–6 h, 1 000 r/min 离心 10 min 分离血清。采用 *Mycoplasma synoviae* Antibody

Test Kit 按照试剂盒说明书对 MS 感染后血清样品进行 MS 抗体检测及阴性、阳性判定。

2 结果与分析

2.1 MS 不同途径感染 SPF 鸡后临床症状及大体解剖病理变化

MS FZ 株新鲜培养物以 10^7 CCU₅₀/羽的剂量通过不同途径感染 56 日龄 SPF 鸡, 在感染后的 20 d, 整个试验过程中未发现明显的呼吸道症状, 但爪垫注射感染组的鸡出现了不同程度的爪垫肿胀, 发病率为 100%; 在感染后 10 d 和 20 d 对肿胀的爪垫解剖发现有大量的肉芽组织增生, 并出现了大量的黄色干酪样块状物质(图 1), 部分还存在血红色样液体, 根据肿胀严重程度进行评分, 轻微、轻度、中度、重度分别为 1–4 分, 无肿胀评为 0 分, 各组爪垫肿胀发生情况以及评分见表 1。

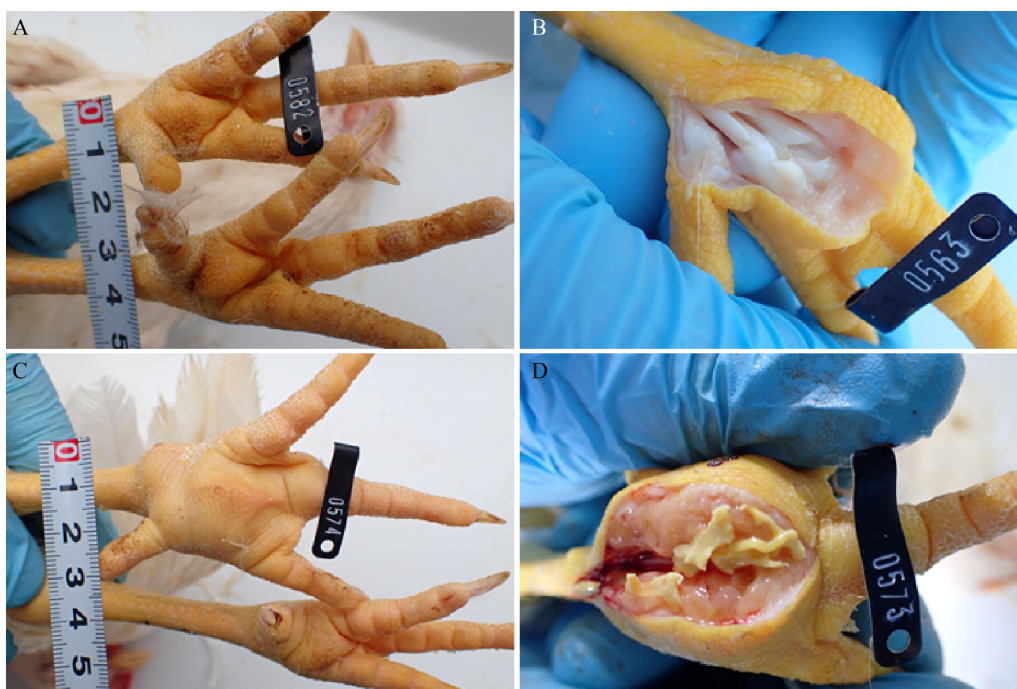


图 1 MS FZ 株以爪垫注射方式感染后与对照组爪垫损伤情况

Figure 1 Footpad lesions in birds challenged by footpad injection with MS FZ strain and non-challenged chickens

Note: A and B: Lesion score 0, no foot-pad lesion was observed; C and D: Lesion score 3, foot-pad markedly swelling and inflamed, with proliferation of granulation tissue and the appearance of a large amount of yellow cheese-like mass

表 1 MS FZ 株以不同方式感染 56 日龄 SPF 鸡 10 d 和 20 d 后气囊炎、爪垫肿胀、胸部囊肿发生情况及损伤评分
Table 1 Air sacculitis, footpad swelling, chest cyst and scores results from 56-day-old SPF chickens at 10 d and 21 d after infection with different routes by MS FZ strain

Groups	10 DPI			20 DPI		
	Air sacculitis	Footpad swelling	Chest cyst	Air sacculitis	Footpad swelling	Chest cyst
G1 (Eye dropping)	0/6* (0)**	0/12 (0)	2/12 (3)	1/6 (1)	0/6 (0)	5/6 (10)
G2 (Single tracheal injection)	2/6 (8)	0/12 (0)	2/12 (2)	0/6 (0)	0/6 (0)	3/6 (4)
G3 (Footpad injection)	0/6 (0)	12/12 (33)	2/12 (2)	0/6 (0)	6/6 (16)	0/6 (0)
G4 (Chest subcutaneous injection)	0/6 (0)	0/12 (0)	12/12 (43)	0/6 (0)	0/6 (0)	5/6 (20)
G5 (Three consecutive tracheal injections)	3/6 (24)	0/12 (0)	3/12 (3)	1/6 (6)	0/6 (0)	2/6 (2)
G6 (Control group)	0/6 (0)	0/12 (0)	0/12 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	2/6 (2)

Note: *: Number of positive samples/Number of tested samples; **: Total lesion scores of tested chickens

通过胸部皮下注射途径感染的鸡出现了严重的胸部囊肿现象。在感染后 10 d 时胸部囊肿发生率为 100%，解剖后囊肿部位有大量的血红色样液体和黄色干酪样块状物质(图 2)。其余各组不同途径感染的少数鸡也出现了轻微的胸部囊肿现象，但解剖后仅存在少量的液体。点眼途径与其他各组相比较，在感染后 20 d 时大多数鸡(5/6)出现了轻度的胸骨囊肿现象。根据胸部囊肿严重程度进行评分，轻微、轻度、中度、重度分别为 1–4 分，无囊肿评

为 0 分，各组胸部囊肿情况以及评分见表 1。

点眼和气管注射感染组在感染后 10 d 和 20 d 剖检时有不同数量的鸡出现了严重的气囊炎，其中点眼感染组在感染后 20 d 有 1 羽(1/6)鸡气囊出现滤泡增多，而单次气管注射或 3 次连续注射方式在感染后 10 d 时与 20 d 时相比，分别有 2 羽(2/6)和 3 羽(3/6)鸡在气囊上出现了大量的黄色块状干酪样物质(图 3)。根据参考文献[7]以气囊炎严重程度分别对胸气囊或腹气囊进行评分：0 为未发现肉

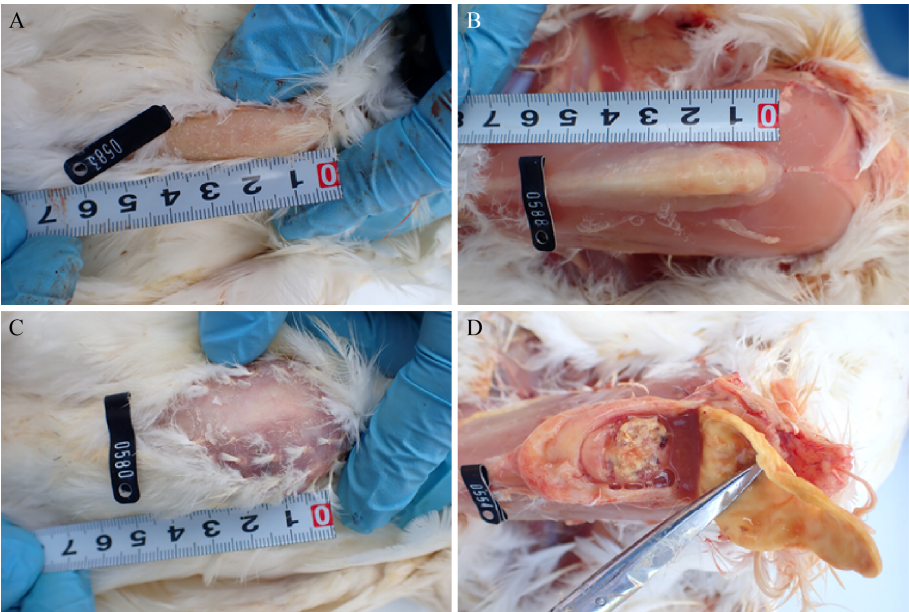


图 2 MS FZ 株以胸部皮下注射方式感染后与对照组胸部囊肿损伤情况
Figure 2 Chest cyst lesions in birds challenged by chest subcutaneous injection with MS FZ strain and non-challenged chickens

Note: A and B: Lesion score 0, no chest cyst lesion was observed; C and D: Lesion score 4, chest markedly swelling and inflamed, with a large amount of blood-red liquid and yellow cheese-like mass

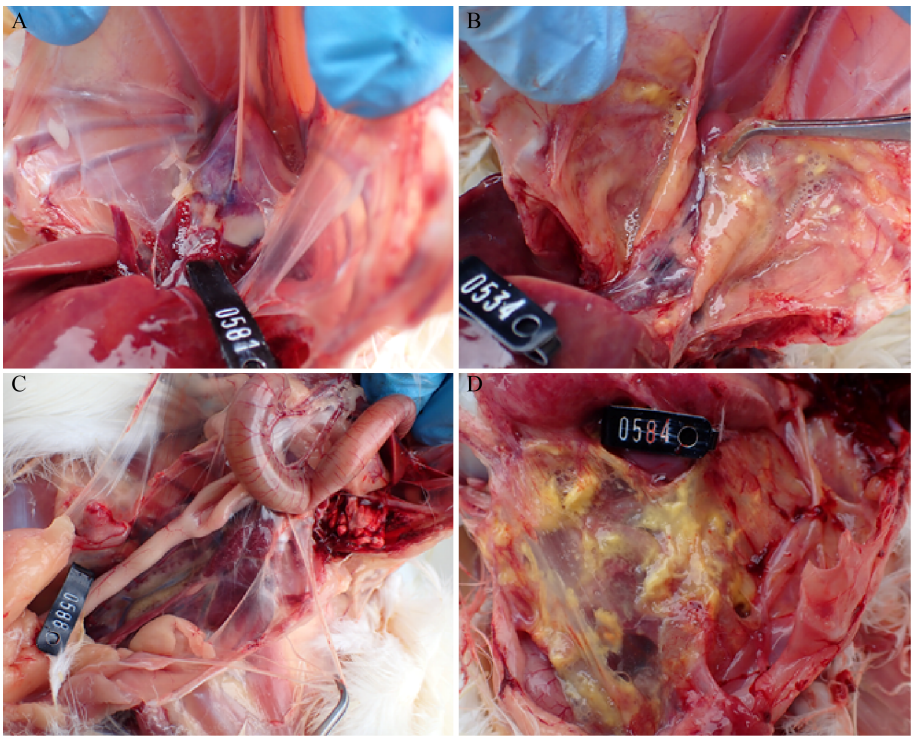


图3 MS FZ 株以气管注射方式感染后与对照组气囊损伤情况

Figure 3 Air sac lesions in birds challenged by tracheal injection with MS FZ strain and non-challenged chickens

Note: A and C: Lesion score 0, no lesion was observed in thoracic air sac (A) and ventral air sac (C); B and D: Lesion score 4, thoracic air sac (B) and ventral air sac (D) markedly swelling and inflamed, with a large amount of yellow cheese-like mass

眼可见气囊损伤；1 为可见淋巴滤泡病变或气囊轻度浑浊；2 为气囊轻度增厚，通常有小的干酪样渗出物聚集；3 为气囊明显增厚，透明度下降，有单一气囊具有大量干酪样渗出物；4 同3，但是气囊损伤在胸气囊或腹气囊有2个或2个以上气囊中发现，根据评分表明气管连续注射 3 次感染组在感染后 10 d 时有 50%的鸡出现了严重的气囊炎，各组气囊炎发生情况以及评分见表 1。

2.2 MS 不同途径感染 SPF 鸡后气管病原再分离结果

采用分离培养的方法对气管进行 MS 病原再分离，结果显示气管注射途径(包括单次注射和连续 3 次注射)在感染后 10 d 和 20 d 的 MS 分离率均为 100% (6/6)，点眼途径在感染后 10 d 和 20 d 分别为 66.7% (4/6)和 100% (6/6)，并且爪垫和胸部注射途径感染也可以从气管中分离到 MS，不同感染时间各组的气管 MS 分离结果见表 2。

2.3 MS 不同途径感染 SPF 鸡的组织病理损伤

点眼感染(G1)、胸部皮下注射感染组(G4)和阴性对照组(G6)气管组织结构正常完整，管壁分为 3 层，由内向外依次为黏膜、黏膜下层和外膜；黏膜由上皮和固有层构成，上皮为假复层柱状上皮，由纤毛细胞、杯状细胞、基细胞、刷细

表2 MS FZ 株以不同途径感染 56 日龄 SPF 鸡 10 d 和 20 d 后气管 MS 病原再分离结果

Table 2 MS re-isolation from trachea of 56-day-old SPF chickens at 10 and 21 DPI with different routes by MS FZ strain

Groups	Re-isolation at 10 DPI	Re-isolation at 20 DPI
G1	4/6*	6/6
G2	6/6	6/6
G3	1/6	2/6
G4	2/6	0/6
G5	6/6	6/6
G6	0/6	0/6

Note: *: No. of positive samples/No. of tested samples

胞和弥散神经内分泌细胞构成；外膜正常；单次气管注射感染组(G2)和爪垫注射感染(G3)分别在感染后 10 d 和 20 d 各有 1 羽鸡气管见黏膜固有层/黏膜下层轻微局灶性炎细胞浸润，但连续 3 次气管注射组(G5)在感染后 10 d 和 20 d 分别有 4 羽鸡的气管黏膜固有层/黏膜下层发生轻微至轻度灶性炎细胞浸润(4/6)。对 G3 和 G4 组爪垫肿胀或胸骨囊肿形成的黄色干酪样块状物质及其附近病变组织进行病理学观察发现有大量的纤维组织和血管增生，同时伴有大量炎性细胞浸润，炎性细胞以单核细胞为主(图 4)。

2.4 MS 不同途径感染 SPF 鸡后 MS 抗体结果

对攻毒后 10 d 和 20 d 的鸡测定 MS 抗体发现，不同途径感染 56 日龄 SPF 鸡后血清阳性率不同，其中爪垫攻毒组在感染后 10 d 和 20 d 的血清

阳性率均为 100% (6/6)，而点眼途径感染后 20 d 时出现 1 羽鸡抗体阳性。与单次气管注射相比，连续 3 次气管注射的方式攻毒可以提高抗体阳性率，各组抗体阳性率见表 3。

3 讨论与结论

由于实施了鸡毒支原体的控制程序，现在 MS 已转变成为全球造成家禽生产经济损失的最重要的细菌病^[8]，各日龄的鸡和火鸡均可感染 MS，尤以 4–18 周的鸡最易感。从 2010 年开始，MS 在我国鸡群中的感染率持续上升，感染率有时高达 100%且能够感染任何年龄的鸡，导致死亡率升高，药物成本和生产成本增加，使得蛋鸡滑液囊炎和肉鸡呼吸道疾病的预防和控制变得更为复杂和困难^[1]。MS 感染主要引起呼吸道疾病、滑液囊炎、EAA 和亚临床感染，但不同 MS 菌株的致病

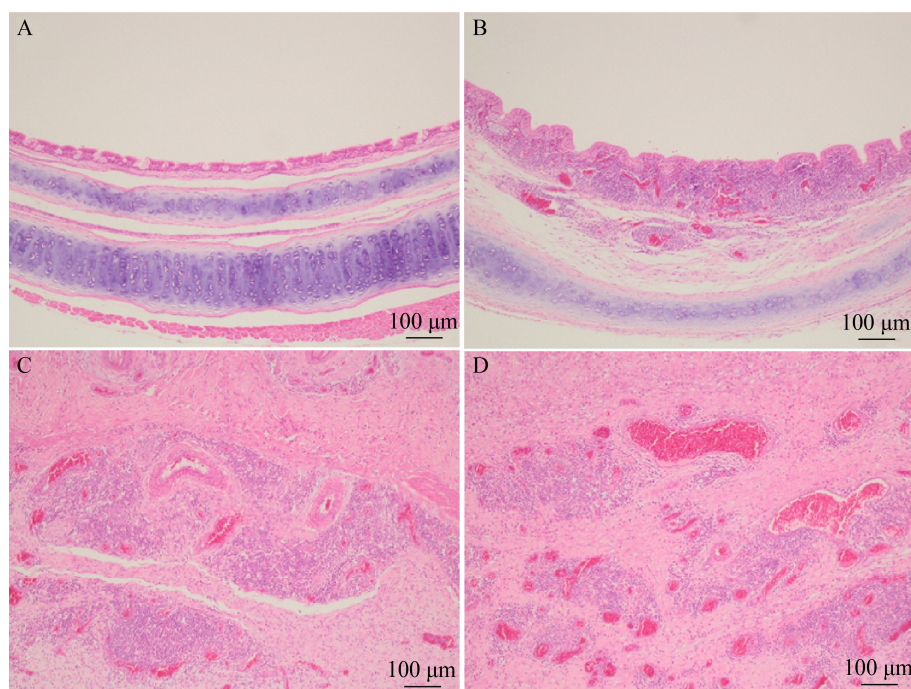


图 4 MS FZ 株感染后气管、爪垫、胸部囊肿的病理损伤情况

Figure 4 Histopathological lesions of trachea, footpad swelling and chest cyst in MS FZ strain challenged and non-challenged chickens

Note: A: Normal tracheal mucosa; B: Tracheal mucosa of chickens infected with MS FZ strain by three consecutive tracheal injections, showing marked thickening of mucosa associated with severe diffuse inflammatory cell infiltration in the lamina propria/submucosa of the tracheal mucosa; C and D: Showing a large number of fibrous tissue and blood vessel proliferation, accompanied by a large number of inflammatory cell infiltration (mainly monocytes) in footpad swelling (C) and chest cyst (D)

表 3 MS FZ 株以不同方式感染 56 日龄 SPF 鸡 10 d 和 20 d 后 MS 血清抗体测定结果

Table 3 Serological response from 56-day-old chickens at 10 and 20 DPI with different methods by MS FZ strain

Groups	ELISA of 10 DPI	ELISA of 20 DPI
G1	0/6*	1/6
G2	3/6	1/6
G3	6/6	6/6
G4	5/6	3/6
G5	5/6	2/6
G6	0/6	0/6

Note: *: Number of positive samples/Number of tested samples (ELISA positive: S/P>0.5)

力差异很大, 有的 MS 菌株感染不一定表现出临床症状^[4], 通常需要其他因素进行诱发。本研究采用分离自上呼吸道的福建本地流行株 FZ 株为感染菌株, 通过点眼、气管注射、爪垫注射、胸部皮下注射等不同途径感染 56 日龄 SPF 鸡, 系统比较了不同感染途径 MS 对 56 日龄 SPF 鸡的致病力和典型病理指征。

不同 MS 分离株的感染性、组织嗜性和致病性不同, 从呼吸道分离的菌株更易引起气囊炎等呼吸道症状, 而从滑膜分离的菌株较易引起滑膜炎^[5], 对 6 株 MS 菌株分别通过爪垫注射和点眼 2 种不同途径感染 1 日龄鸡后进行组织病理变化观察和病原再分离, 结果表明不同的菌株对不同组织具有不同的致病性, 部分菌株通过点眼感染仅在上、下呼吸系统有 MS 存在并引发损伤, 并且对同一菌株通过点眼或爪垫注射对不同的组织器官具有不同的病原分布和病理损伤^[4]。对 11 日龄商品肉鸡以气溶胶和爪垫注射方式感染不同 MS 菌株, 同时采用新城疫病毒和传染性支气管炎病毒二联活疫苗进行诱发, MS 可以引起明显的爪垫肿胀, 导致气管黏膜发生病理变化, 而且不同菌株的致病力不同^[9]; MS 感染影响产蛋量, 降低产蛋数和平均重^[10]; 对 MS 与产异常蛋之间的关系研究表明, 有 2 株 MS 菌株通过气管接种在感染后 21-42 d 日产蛋量下降 11%, EAA 发生率增加到

24.5%, 同时出现了软壳蛋, 其蛋壳表面发生结构变化^[11]。本研究通过爪垫或胸部皮下注射途径均可使 100% 的鸡发病, 出现爪垫肿胀或胸部囊肿; 点眼、单次或连续 3 次气管注射感染鸡在感染 10 d 后的发病率分别为 0.0%、33.3% 和 50.0%, 因此, 不仅不同 MS 菌株在感染过程中的感染性、组织嗜性和致病性有所不同, 而且对同一菌株以不同途径感染, 其发病率和临床病理变化也不同。本研究成功利用 MS FZ 株通过不同途径单独感染 56 日龄 SPF 鸡导致了明显的局部临床病理变化, 并且脚垫和胸部皮下注射途径的发病率高, 建立的感染模型可以用作新的 MS 防控方案有效性的评估。

通过对气管、肿胀爪垫和囊肿的胸部病变组织进行病理学观察, 点眼、胸部皮下注射感染 MS 不影响气管组织结构, 而单次气管注射和爪垫注射感染分别在感染后有个别鸡气管黏膜固有层/黏膜下层出现轻微局灶性炎细胞浸润, 但连续 3 次气管注射在感染后 10 d 和 20 d 大部分鸡(4/6)的气管黏膜固有层/黏膜下层发生轻微至轻度灶性炎性细胞浸润, 对 11 日龄商品肉鸡以气溶胶和爪垫注射方式感染 MS 后, 采用新城疫病毒(Newcastle Disease Virus, NDV)和传染性支气管炎病毒(Infectious Bronchitis Virus, IBV)二联活疫苗诱发导致气管黏膜层增厚和炎性细胞浸润^[9], 因此, 对气管造成病理损伤的严重程度不仅与感染方式相关, 还与是否存在其他诱发因素相关。研究发现田间临床发生 MS 感染的病鸡主要以关节腔和爪垫大量脓液为主要特征, 组织病理学以炎性细胞渗出、崩解、坏死为主^[12], 而本研究对肿胀爪垫或囊肿的胸部病变组织观察发现有大量的肉芽组织增生, 以及纤维组织和血管增生, 同时伴有大量炎性细胞浸润, 炎细胞以单核细胞为主。因此本研究表明感染途径不同导致组织病理变化不同, 在生产实践中导致 MS 感染后临床表现和解剖病变不同或许与感染途径相关。

MS 感染很有可能作为原发因素继发蛋鸡感染大肠杆菌,促使蛋鸡大肠杆菌腹膜炎综合征复杂化^[13],此外 IBV 可以促进鸡在 MS 气溶胶暴露下的滑液囊炎发生,并且关节病理损伤的发生率与 IBV 毒株具有依赖关系^[14]。MS 感染后免疫 NDV 活疫苗的鸡对 NDV 疫苗的抗体水平较低、持续时间短,表明免疫 NDV 疫苗前发生 MS 感染或许会造成免疫反应失败^[15],而从 MS 感染鸡的上呼吸道进行病原分离更为可靠^[5]。有研究报道 NDV 和 IBV 二联活疫苗可以加重 11 日龄商品肉鸡感染 MS 后的气管组织病理学损伤^[9],而本研究中气管病原再分离试验结果表明气管注射途径(包括单次注射和连续 3 次注射)在感染后 10 d 和 20 d 的分离率均为 100%,点眼途径在感染后 10 d 和 20 d 的分离率也可分别达到 66.7%和 100%,并且爪垫和胸部注射途径感染虽不能引起明显的气管组织病理变化,但少部分鸡气管中也存在 MS,所以在田间不论发生何种途径的 MS 感染,均对其他疫苗的免疫效果具有潜在的威胁或影响,或与 IBV 和 NDV 混合感染促进和/或加重感染后的临床症状和病理损伤,导致更严重的经济损失,因此,在生产中当未有明显的 MS 感染临床症状而通过呼吸系统免疫弱毒活疫苗时,应当对 MS 感染情况进行病原学检测,正确使用疫苗,避免诱发 MS 临床症状的出现。

MS 感染后 3 d 通过分离培养和/或 PCR 方法可以检测到病原体,而通过血清平板凝集(Serum Plate Agglutination, SPA)或 ELISA 方法在培养或 PCR 检测阳性后 3–4 周才可检测到血清抗体阳性^[16]。本研究对不同途径攻毒 10 d 和 20 d 后的鸡测定 MS 抗体发现血清阳性率不同,其中爪垫攻毒组在感染后 10 d 和 20 d 的血清阳性率均为 100%,胸部皮下注射组在感染后 10 d 和 20 d 的血清阳性率分别为 83.3%和 50.0%,而点眼途径感染后 20 d 时仅出现 1 羽鸡(16.7%)抗体阳性,与单次气管注射相比,连续 3 次气管注射的方式攻毒可

以提高抗体阳性率,结果表明不同感染途径造成 MS 抗体开始出现阳性的时间不同。另外,通过对临床发生气囊炎、胸骨囊肿等病理症状的鸡进行 MS 抗体检测发现,临床病理症状出现与否和抗体阳性不具有相关性,因此与 MS 病原检测相比,当在生产实践中以 MS 抗体检测或临床症状作为诊断标准时,可能会造成延误诊断、假阴性或感染率偏低等问题,在临床中应当对这一问题给予足够重视。

通过 MS 不同方式感染 56 日龄 SPF 鸡的临床症状和临床病理变化、气管组织病理损伤、气管 MS 再分离和 MS 抗体检测,结果表明 MS 不同方式感染后出现的临床症状和发病率差异较大,其中点眼感染临床症状最轻、MS 抗体转阳最迟,但气管组织也具有较高的病原再分离率,而气管注射、爪垫注射、胸部皮下注射等方式均可引起明显的局部临床病理变化或临床症状,具有很高的发病率,因此,本研究建立了可靠的 8 周龄 SPF 鸡的 MS 人工感染发病模型,筛选出了 MS 人工感染后典型的病理指征或致病力评价方法,其中点眼感染途径和气管注射途径以气管病原再分离作为主要指征,辅以气囊炎进行评价,而胸部皮下注射和爪垫注射途径分别以胸部囊肿和爪垫肿胀作为主要病理指征进行评价。本研究建立的人工发病模型将为临床认识、诊断和开发疫苗,而有效防控 MS 在鸡群中的感染提供科学方法或理论依据。

REFERENCES

- [1] Xue J, Xu MY, Ma ZJ, Zhao J, Jin N, Zhang GZ. Serological investigation of *Mycoplasma synoviae* infection in China from 2010 to 2015[J]. Poultry Science, 2017, 96(9): 3109-3112
- [2] Sun SK, Lin X, Chen F, Wang DA, Lu JP, Qin JP, Luo TR. Epidemiological investigation of *Mycoplasma synoviae* in native chicken breeds in China[J]. BMC Veterinary Research, 2017, 13(115). DOI: 10.1186/s12917-017-1029-0
- [3] Chen XH, Guo YN, Si DD, Xu JY, Jiang XJ, Guo L, He SH. Epidemiological investigation and analysis of *Mycoplasma synoviae* in infection in chickens in Ningxia region[J]. Chinese journal of preventive veterinary medicine, 2020, 42(3): 234-238 (in Chinese)

- 陈秀红, 郭亚男, 司朵朵, 徐婧祎, 姜肖军, 郭磊, 何生虎. 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
- [4] Lockaby SB, Hoerr FJ, Lauerma LH, Kleven SH. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in broiler chickens[J]. Veterinary Pathology, 1998, 35(3): 178-190
- [5] Kleven SH, Ferguson-Noel N. *Mycoplasma synoviae* infection[A]// Saif YM, Fadly AH, Glisson JR, McDougald JR, Nolan NK, Swayne DE. Diseases of Poultry[M]: 12th Edition. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2008: 845-856
- [6] Kursa O, Pakula A, Tomczyk G, Paško S, Sawicka A. Eggshell apex abnormalities caused by two different *Mycoplasma synoviae* genotypes and evaluation of eggshell anomalies by full-field optical coherence tomography[J]. BMC Veterinary Research, 2019. DOI: 10.1186/s12917-018-1758-8
- [7] Kleven SH, King DD, Anderson DP. Airsacculitis in broilers from *Mycoplasma synoviae*: effect on air-sac lesions of vaccinating with infectious bronchitis and Newcastle virus[J]. Avian Diseases, 1972, 16(4): 915-924
- [8] Zhu L, Shahid MA, Markham J, Browning GF, Noormohammadi AH, Marenda MS. Genome analysis of *Mycoplasma synoviae* strain MS-H, the most common *M. synoviae* strain with a worldwide distribution[J]. BMC Genomics, 2018. DOI: 10.1186/s12864-018-4501-8
- [9] Gong XW, Chen QW, FergusonNoel NL, Zheng FY, Stipkovits L, Szathmary SS, Liu YS. Comparison the pathogenicity of three *Mycoplasma synoviae* isolates from broiler flocks[J]. Microbiology China, 2019, 46(4): 790-797 (in Chinese)
- 宫晓炜, 陈启伟, Ferguson-Noel Naola, 郑福英, Stipkovits Laszlo, Szathmary Susan, 刘永生. 3 株禽滑液囊支原体分离株致病性的比较和评价[J]. 微生物学通报, 2019, 46(4): 790-797
- [10] Catania S, Gobbo F, Bilato D, et al. Two strains of *Mycoplasma synoviae* from chicken flocks on the same layer farm differ in their ability to produce eggshell apex abnormality[J]. Veterinary Microbiology, 2016, 193: 60-66
- [11] Kursa O, Tomczyk G, Sawicka A. Prevalence and phylogenetic analysis of *Mycoplasma synoviae* strains isolated from Polish chicken layer flocks[J]. Journal of Veterinary Research, 2019, 63(1): 41-49
- [12] Ding MJ, Zhou YY, Zhang Y, Zhang D, Zhou YQ, Yin XF, Zhang XF. Pathological observation of *Mycoplasma synoviae* infecting chickens[J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2020, 52(12): 66-69 (in Chinese)
- 丁美娟, 周永银, 张懿, 张丹, 周勇岐, 尹秀凤, 张小飞. 鸡感染滑液囊支原体的病理学观察[J]. 畜牧与兽医, 2020, 52(12): 66-69
- [13] Raviv Z, Ferguson-Noel N, Laibinis V, Wooten R, Kleven SH. Role of *Mycoplasma synoviae* in commercial layer *Escherichia coli* peritonitis syndrome[J]. Avian Diseases, 2007, 51(3): 685-690
- [14] Landman WJM, Feberwee A. Aerosol-induced *Mycoplasma synoviae* arthritis: the synergistic effect of infectious bronchitis virus infection[J]. Avian Pathology, 2004, 33(6): 591-598
- [15] De Cássia Figueira Silva R, Do Nascimento ER, De Almeida Pereira VL, Barreto ML, Do Nascimento MDGF. *Mycoplasma synoviae* infection on Newcastle disease vaccination of chickens[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2008, 39(2): 384-389
- [16] Ewing ML, Cookson KC, Phillips RA, Turner KR, Kleven SH. Experimental Infection and Transmissibility of *Mycoplasma synoviae* with Delayed Serologic Response in Chickens[J]. Avian Diseases, 1998, 42(2): 230-238