

TaqMan 荧光定量 PCR 检测滑液囊支原体方法的建立及其感染鸡血液内载量测定

朱悦^{1,2}, 祁晶晶², 武梦思², 张广冻², 丁思羽³, 陈玥彤^{2,4}, 高崧^{*1}, 于圣青^{*1,2,3}

1 扬州大学 兽医学院, 江苏 扬州 225009

2 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

3 扬州优佳创生物科技有限公司, 江苏 扬州 225261

4 锦州医科大学 畜牧兽医学院, 辽宁 锦州 121000

朱悦, 祁晶晶, 武梦思, 张广冻, 丁思羽, 陈玥彤, 高崧, 于圣青. TaqMan 荧光定量 PCR 检测滑液囊支原体方法的建立及其感染鸡血液内载量测定[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3648-3657.

ZHU Yue, QI Jingjing, WU Mengsi, ZHANG Guangdong, DING Siyu, CHEN Yuetong, GAO Song, YU Shengqing. Establishment of TaqMan fluorescence quantitative PCR method for detecting *Mycoplasma synovium* and determination of blood load in infected chickens[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3648-3657.

摘要:【背景】滑液囊支原体(*Mycoplasma synoviae*, MS)是禽类的常见病原, 严重危害家禽养殖业的发展。MS 易与其他病原混合感染, 给临床诊断造成困难, 因此亟须建立一种快速、准确、灵敏的检测方法对疑似患病禽进行快速诊断, 以降低经济损失。【目的】建立一种检测 MS 的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法, 测定 MS 在感染鸡血液内的载量变化, 为临床检测 MS 感染提供技术支持。【方法】参考 GenBank 中登录的 MS 基因保守区域序列设计特异性引物和探针, 以温度梯度 qPCR 法确定最适退火温度, 用矩阵法优化其引物和探针加入量, 通过提取 MS 0801 基因组作为模板构建标准曲线, 并进行特异性、灵敏度、重复性试验, 建立一种检测 MS 的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法。使用建立的方法检测滴鼻攻毒和足垫攻毒后 MS 在感染鸡血液内的载量变化。【结果】建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法最佳退火温度为 55 °C, 引物和探针(10 mol/L)加入量分别为 0.8 mL 和 0.4 mL; 扩增曲线具有良好的线性关系, $R^2 > 0.99$; 特异性强, 仅对 MS 有特异性反应, 对其他病原均无扩增反应; 敏感性高, 最低检测限为 25 copies/μL; 重复性好, 批间试验和批内试验变异系数均小于 2%。通过 TaqMan 荧光定量 PCR 检测 MS 在感染鸡血液内的动态变化, 发现两个攻毒组 MS 含量的峰值和总体波动无明显差异, 但足垫攻毒的 MS 在血液中的增殖要快于滴鼻攻毒。【结论】本实验建立了一种能够快速检测 MS 的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法, 并用于检测 MS 在感染鸡血液内的动态变化, 为临床上检测 MS 感染提供了技术支撑, 为疫苗免疫评价方法提供了新的思路。

关键词: 滑液囊支原体; TaqMan 荧光定量 PCR; 攻毒模型; 增殖变化

资助项目: 扬州市市级计划-现代农业项目(YZ2022046); 国家重点研发计划(2016YFD0500805)

This work was supported by the Yangzhou Municipal Plan-Modern Agriculture Project (YZ2022046), and the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500805).

*Corresponding authors. E-mail: GAO Song, gsong@yzu.edu.cn; YU Shengqing, yus@shvri.ac.cn

Received: 2023-12-05; Accepted: 2023-12-27; Published online: 2024-02-21

Establishment of TaqMan fluorescence quantitative PCR method for detecting *Mycoplasma synovium* and determination of blood load in infected chickens

ZHU Yue^{1,2}, QI Jingjing², WU Mengsi², ZHANG Guangdong², DING Siyu³,
CHEN Yuetong^{2,4}, GAO Song^{*1}, YU Shengqing^{*1,2,3}

1 College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

2 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

3 Yangzhou Youjiachuang Biotechnology Company Limited, Yangzhou 225261, Jiangsu, China

4 College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning, China

Abstract: [Background] *Mycoplasma synoviae* (MS) is a common pathogen in poultry, posing a serious threat to the development of the poultry industry. The co-infection of MS with other pathogens makes it difficult to diagnose based on clinical symptoms. Therefore, it is urgent to establish a rapid, accurate, and sensitive method for rapid diagnosis of suspected sick birds to reduce economic losses. [Objective] To establish a TaqMan fluorescence quantitative PCR method for determining the load of MS in the blood of infected chicken, and to provide technical support for the clinical detection of MS infection. [Methods] A pair of specific primers and a probe were designed according to the conserved sequence of MS gene in GenBank. The optimal annealing temperature was determined by temperature gradient qPCR, and the amounts of primers and the probe were optimized by the matrix method. The standard curve was established with the genome of MS 0801 as a template, and the specificity, sensitivity, and repeatability of the established method were evaluated. Furthermore, the established method was used to measure the MS load in the blood of chicken samples infected via nasal drip or footpad challenge. [Results] The optimal annealing temperature of the established method was 55 °C, and the amounts of primers and the probe (10 mol/L) were 0.8 mL and 0.4 mL, respectively. The amplification curve had a good linear relationship, with $R^2 > 0.99$. The method had strong specificity since it had specific reaction only to MS and no reaction to other pathogens. In addition, the method had high sensitivity, with the lower limit of detection being 25 copies/ μ L blood. The coefficients of variation of inter-batch and intra-batch experiments were less than 2%, which indicated that the method had high repeatability. There was no significant difference in the peak or overall fluctuations of MS load in the chicken samples infected via nasal drip or footpad challenge, while the proliferation of MS in the blood of footpad challenge was faster than that of nasal drip challenge. [Conclusion] A TaqMan fluorescence quantitative PCR method for rapid detection of MS was established and used to detect the dynamic changes of MS in the blood of infected chicken. This method provided technical support for clinical detection of MS infection and new ideas for evaluation of vaccination performance.

Keywords: *Mycoplasma synoviae*; TaqMan fluorescence quantitative PCR; challenge model; proliferation changes

滑液囊支原体(*Mycoplasma synoviae*, MS)是柔膜体纲(*Mollicutes*)支原体属(*Mycoplasma*)^[1], 主要寄生于鸡、火鸡、鸽子和鸭子等禽类^[2]。各个日龄的禽类都可感染, 但3周左右雏鸡最易感, 发病率为5%–15%, 死亡率为1%–10%^[3–4]。MS感染主要表现为关节症状与呼吸道症状^[5–6], 影响家禽的生产性能, 并且其通常会导致继发感染, 使得鸡群因其他疾病导致死亡率上升或影响鸡群生长, 造成养殖业的巨大损失^[7]。因此建立一种快速、准确、灵敏的检测方法有利于在病原感染早期及时采取有效的防控措施, 避免更大的损失。

支原体净化、疫苗防疫和药物治疗等方法是有用的MS防控策略, 由于国内现在对支原体净化还处于初级阶段, 大部分鸡场主要还是采取“药物+疫苗”为主的防控措施。目前, MS疫苗包括弱毒活疫苗和灭活疫苗两类。活疫苗的适用范围主要是尚未感染的鸡群, 已经感染的鸡群并不适用, 注射疫苗后可能会加重病情^[8]。灭活疫苗是目前正在研究中的一种疫苗, 在已经进行的试验中免疫效果较为理想, 具有潜在的应用前景^[9]。但是, 国内养殖场对MS灭活疫苗的保护效果评价不一。评价灭活疫苗的保护效果需要稳定可靠的致病模型和客观准确的疫苗保护评价方法。

本试验通过建立MS的TaqMan荧光定量PCR方法, 测定滴鼻攻毒和足垫攻毒无特定病原(specific-pathogen free, SPF)鸡血液内MS载量的动态变化, 为建立稳定可靠的MS致病模型提供参考, 为MS感染的及早检测和疫苗保护效果评价奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 样品

滑液囊支原体(*Mycoplasma synoviae*) (0801、

JS1、HB1、SH1)、鸡毒支原体临床分离株(*Mycoplasma gallisepticum*) 013、衣阿华支原体(*Mycoplasma iowae*) 695、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) CVCC4098、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DE47和鸡白痢沙门氏菌(*Salmonella pullorum*) 1218均由中国农业科学院上海兽医研究所畜禽细菌性传染病创新团队提供。

20日龄SPF鸡购自浙江立华农业科技有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

猪血清, Gibco公司; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD), Roche公司; 氯化钠, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 细菌基因组DNA提取试剂盒和血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒, 北京天根生化科技有限公司; AceQ Universal U⁺ Probe Master Mix V2, 南京诺唯赞生物科技有限公司。微量分光光度计, NanoDrop公司; 荧光定量PCR仪, Eppendorf公司。

1.3 培养基和培养方法

支原体基础培养基, 青岛海博生物技术有限公司。滑液囊支原体液体培养基^[10]: 支原体基础培养基33.0 g, 定容至900 mL双蒸水中, 121 °C灭菌15 min, 冷却后加入100 mL灭活猪血清和10 mL 1% NAD, 混匀后4 °C保存; LB液体培养基(g/L): 蛋白胨10.0、酵母提取物5.0、NaCl 10.0。将–80 °C冻存的MS 0801、MS JS1、MS HB1、MS SH1、MG 013和MI 695按10%接种量转接至4 mL支原体液体培养基(含10%猪血清)中, 37 °C、5% CO₂静置培养1–3 d, 待液体由红变橘黄后按5%接种量转接至新的支原体液体培养基(含10%猪血清), 按上述方法培养至培养基由红变橘黄后备用。将–80 °C冻存菌株SA CVCC4098、*E. coli* DE47和SP 1218

取出,按 1%接种量转接至 5 mL LB 液体培养基,37 °C、220 r/min 振荡培养 12 h,菌液由澄清变浑浊备用。

1.4 引物和探针设计

根据 GenBank 中收录的所有 MS 的基因序列进行同源性聚类分析,确定其保守基因,然后根据保守基因 MS 0151 序列,利用 Primer 5.0 软件设计特异性引物和 TaqMan 探针(表 1),由上海睿勉生物科技有限公司合成。

1.5 菌株 DNA 的提取

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取各菌株培养液中的基因组。提取的基因组 DNA 用微量分光光度计测定 DNA 的浓度,并于-20 °C保存备用。

1.6 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的建立

将引物和探针均稀释为 10 μmol/L,采用矩阵法对 TaqMan 荧光定量 PCR 反应体系进行优化。反应体系(20 μL): AceQ Universal U⁺ Probe Master Mix V2 10 μL,引物和探针加入量按表 2 进行不同的组合, DNA (0.25 ng/μL) 2 μL, ddH₂O 补足 20 μL。进一步优化退火温度,反应条件: 37 °C 污染消化 2 min; 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 退火温度分别设为 53、55、57、59、61、63 °C,在设置的退火温度下退火/延伸 30 s, 45 个循环。循环延伸结束时进行荧光信号检测,荧光通道选择 JOE。以同一浓度的 MS 基因组为模板,对所得的循环阈值(cycle threshold, C_t)进行比较。每次反应均设置阴性对照。当不存在

非特异性信号时,产生 C_t 值最小的确定为最佳引物、探针和退火温度。

1.7 标准曲线的建立

将提取的 MS 0801 基因组进行 5 倍倍比稀释,分别以稀释好的基因组为模板,按照 1.6 优化后的 TaqMan 荧光定量 PCR 反应体系和反应条件进行荧光定量 PCR 扩增,得出的结果用 Excel 软件分析拷贝数与 C_t 值之间的关系,以 log₁₀ 拷贝数为横坐标、C_t 值为纵坐标绘制标准曲线。

1.8 特异性试验

分别用 MS JS1、MS HB1、MS SH1、MG 013、MI 695、*E. coli* DE47、SP 1218、SA CVCC4098 菌株基因组为模板,按照 1.6 优化后的 TaqMan 荧光定量 PCR 反应体系和反应条件进行扩增,ddH₂O 为阴性对照,验证方法的特异性。

1.9 灵敏度试验

MS 0801 基因组以 2.49×10⁻¹–2.49×10⁵ copies/μL 为模板,按照 1.6 优化后的 TaqMan 荧光定量 PCR 反应体系和反应条件进行 TaqMan 荧光定量 PCR 扩增,同时与常规 PCR 方法进行比较。常规 PCR 反应体系(20 μL): 2×Taq Master Mix 10 μL,引物 MS 0151F (10 μmol/L)和 MS 0151R (10 μmol/L)各 1 μL, DNA (0.25 ng/μL) 2 μL, ddH₂O 补足 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Primer and probe sequences

引物/探针	引物序列	大小
Primer/Probe	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
MS 0151F	GTACTAGATGGGTTGATTCAAGTTAT	26
MS 0151R	ATTCAGCTGCTGTTTGTGAAAT	22
MS 0151 probe	JOE-AGCTGCTGACGAAATGATAGCGCA-BHQ1	24

表 2 引物和探针加入量

Table 2 The amount of the primer and the probe added

组合	MS0151 引物	MS0151 探针
Combination	MS0151 primer (μL)	MS0151 probe (μL)
1	0.2	0.1
2	0.4	0.2
3	0.6	0.3
4	0.8	0.4
5	1.0	0.5

1.10 重复性试验

将 MS 0801 基因组样本于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分别保存 1、2、3 周后稀释为 $2.49\times 10^3\text{--}2.49\times 10^5\text{ copies}/\mu\text{L}$ ，按照 1.6 优化后的 TaqMan 荧光定量 PCR 反应体系和反应条件进行荧光定量 PCR 扩增，每次做 3 个重复。通过统计学方法分析同一批次和不同批次的 C_t 值之间的变异系数(coefficient of variation, CV)，评价该双重荧光定量 PCR 检测体系的重复性。

1.11 鸡体感染试验

将 30 只 20 日龄 SPF 鸡随机分为 3 组，包括 MS 滴鼻攻毒组、MS 足垫攻毒组和对照组，攻毒菌株为 MS 0801，攻毒剂量为每只 $5\times 10^5\text{ CCU}/0.1\text{ mL}$ 。对照组不做处理。分别于感染后 0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、7、14 和 28 d 通过翅静脉采血。

1.12 血液样本检测

按照血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒说明书分别提取血液样品中的基因组。用建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对提取的各血液样品基因组进行检测，根据 C_t 值用标准曲线计算拷贝数，得出每微升血液中的 MS 含量。

1.13 统计分析

采用 SPSS 28.0 (IBM) 统计分析软件进行统计分析。采用夏皮洛-威尔克法正态性检验评价数据是否服从正态分布。组间差异分析采用单因素方差分析。定义 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的优化结果

经过筛选，确定 TaqMan 荧光定量 PCR 的最适反应体系($20\text{ }\mu\text{L}$)：AceQ Universal U⁺ Probe Master Mix V2 $10\text{ }\mu\text{L}$ ，引物 MS0151F ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 和 MS0151R ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 各 $0.8\text{ }\mu\text{L}$ ，MS0151 探针 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) $0.4\text{ }\mu\text{L}$ ，模板 $2\text{ }\mu\text{L}$ ，ddH₂O 补足 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。确定 TaqMan 荧光定量 PCR 的最适反应条件： $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 污染消化 2 min ； $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ； $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s ， $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s ，45 个循环。

2.2 标准曲线的建立

根据反应体系中的拷贝数和扩增的 C_t 值，计算得到标准曲线为： $y = -3.2507x + 44.16$ ，如图 1 所示，其中 x 为 \log_{10} 基因组拷贝数， y 为 C_t 值，相关系数为 0.993 1，大于 0.99，表明具有良好的线性关系。

2.3 荧光定量 PCR 方法的特异性试验结果

特异性试验结果显示，MS 各分离株(JS1、HB1、SH1)均出现相对应的特异性扩增曲线，MG、MI、*E. coli*、SP、SA 菌株基因组 DNA 及阴性对照(ddH₂O)均无扩增曲线(图 2)，表明建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的特异性良好。

2.4 荧光定量 PCR 方法的灵敏度试验结果

灵敏度试验结果显示，TaqMan 荧光定量 PCR 可检测到的最低拷贝数为 $2.49\times 10^1\text{ copies}/\mu\text{L}$ (图 3)，

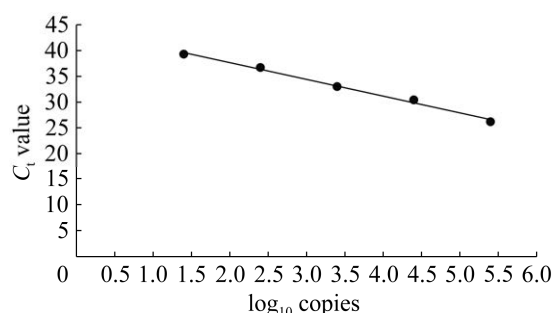


图 1 TaqMan 荧光定量 PCR 标准曲线

Figure 1 Standard curve of TaqMan fluorescence quantitative PCR.

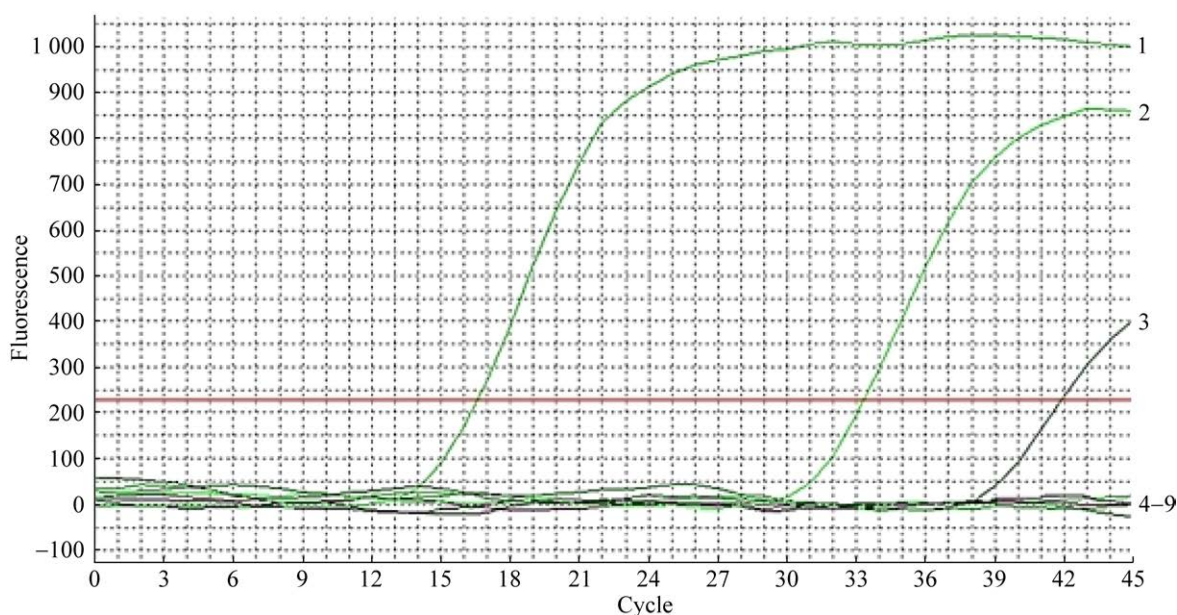


图2 TaqMan 荧光定量 PCR 的特异性试验 1-3 分别为 MS SH1、MS JS1、MS HB1 基因组扩增曲线；4-9 分别为 MG、MI、*E. coli*、SP、SA 菌株基因组及阴性对照扩增曲线

Figure 2 Specificity test of TaqMan fluorescence quantitative PCR. 1-3: Genome amplification curves of MS SH1, MS JS1, MS HB1 strains, respectively; 4-9: Genome amplification curves of MG, MI, *E. coli*, SP, SA strain and blank control, respectively.

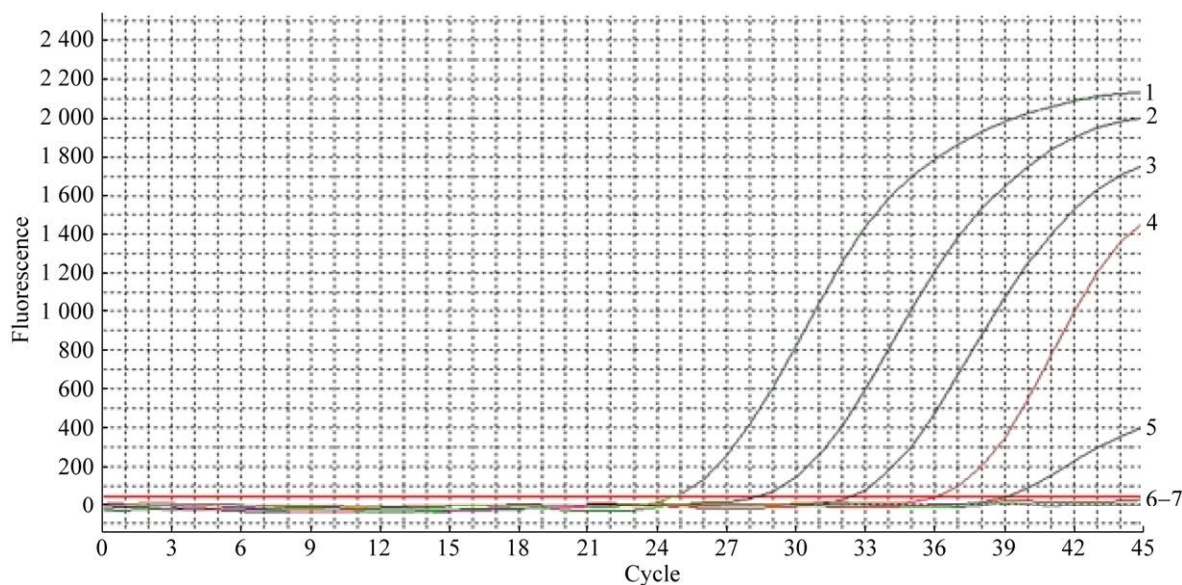


图3 荧光定量 PCR 的灵敏度检测 1-7 分别为 MS 0801 基因组以 2.49×10^5 、 2.49×10^4 、 2.49×10^3 、 2.49×10^2 、 2.49×10^1 、 2.49×10^0 、 2.49×10^{-1} copies/ μL 为模板的扩增曲线

Figure 3 Sensitivity detection of fluorescence quantitative PCR. 1-7: Genome amplification curves of MS 0801 at 2.49×10^5 , 2.49×10^4 , 2.49×10^3 , 2.49×10^2 , 2.49×10^1 , 2.49×10^0 , and 2.49×10^{-1} copies/ μL , respectively.

普通 PCR 可检测到的最低拷贝数为 2.49×10^5 copies/ μL (图 4), 两者相比, 表明本试验所建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法灵敏度较高。

2.5 荧光定量 PCR 方法的重复性试验结果

重复性试验结果表明, 各组内和组间的变异系数均小于 2% (表 3), 因此本试验所建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的重复性较好。

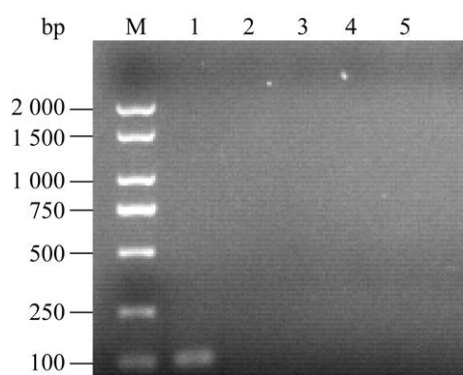


图 4 普通 PCR 的灵敏度检测 M: DL2000 DNA Marker; 1-5 分别为 2.49×10^5 、 2.49×10^4 、 2.49×10^3 、 2.49×10^2 、 2.49×10^1 copies/ μL 的 MS 0801 基因组为模板的扩增条带

Figure 4 Sensitivity detection of common PCR. M: DL2000 DNA Marker; 1-5: Genome amplification bands of MS 0801 at 2.49×10^5 , 2.49×10^4 , 2.49×10^3 , 2.49×10^2 , and 2.49×10^1 copies/ μL , respectively.

表 3 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的变异系数

Table 3 Coefficient of variation of TaqMan fluorescence quantitative PCR method

Repeatability assay	Template concentration (copies/ μL)	Average ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	CV (%)
Repeated within group	2.49×10^5	26.17 ± 0.13	0.50
	2.49×10^4	30.29 ± 0.31	1.03
	2.49×10^3	32.90 ± 0.18	0.56
Repeated testing between groups	2.49×10^5	26.13 ± 0.27	1.04
	2.49×10^4	30.39 ± 0.12	0.39
	2.49×10^3	33.02 ± 0.14	0.43

2.6 血液中 MS 含量的检测

分别对各时间点的各组 10 只鸡血液中的 MS 含量进行检测, 结果如图 5 所示, 可见 MS 在感染鸡血液内呈动态变化。由图 5 可见, 攻毒后 6 h, 滴鼻攻毒组和足垫攻毒组均可在血液中检测出 MS; 攻毒后 1 d, 两组 MS 含量达到峰值, 而后下降, 两组峰值无显著差异; 攻毒后 2-7 d, 两组 MS 含量均略微上下波动。攻毒后 14 d, 足垫攻毒组 MS 含量逐渐上升, 再次达到较高水平, 而后含量下降; 攻毒后 21 d, 滴鼻攻毒组 MS 含量逐渐上升, 再次达到较高水平, 而后含量下降, 所以足垫攻毒组 MS 在血液中的增殖要快于滴鼻攻毒组。在攻毒后 4 d, 滴鼻攻毒组 MS 含量显著高于足垫攻毒组; 在攻毒后 14 d, 足垫攻毒组 MS 含量显著高于滴鼻攻毒组; 在其他时间点, 两个攻毒组之间的 MS 含量无显著差异。

3 讨论

MS 近年来在我国广泛流行, 滑液囊炎和腱鞘炎等是较为常见的临床症状。由于其独特的传播特点, 并且呈现出与多种病原混合感染的态势, 极大地加快了疫病的传播和变异的速度, 提

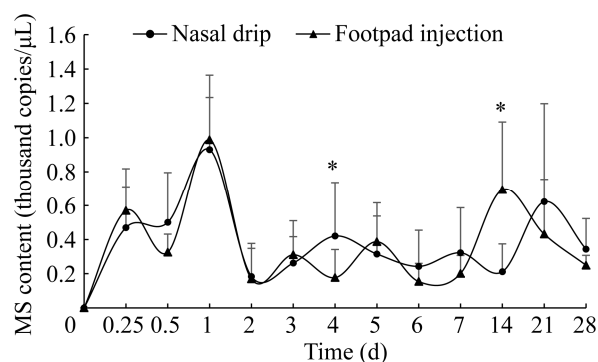


图 5 血液内 MS 含量动态变化

Figure 5 Dynamic changes of MS content in blood. *: $P < 0.05$.

高了防疫的难度。因此,如何尽早、快速、准确地检测出鸡群感染是一个难题,通过疫苗免疫最大程度降低临床发病比例已成为当务之急。

目前,MS 感染的诊断方法有临床诊断、病原分离培养、血清学方法和分子生物学方法等^[11]。这些检测方法各有优缺点,其中,临床诊断方法方便快捷,但具有滞后性,并且主观性大,无法及早、准确地诊断结果。MS 的分离培养是确诊 MS 感染的金标准^[12],但耗时太长。血清学方法也是常用的检测方法^[13],具有快速、结果易判读等优点,但同时存在假阳性的问题。分子生物学方法也已用于 MS 的检测^[14],具有敏感、快速、可定量的优点,但对实验室设备和技术人员的要求较高。

PCR 作为分子生物学常用的检测方法之一,因其灵敏性高、特异性强、操作简便等优点而被广泛应用。普通 PCR 需要在 PCR 扩增结束后通过凝胶电泳才能观看结果且不能定量分析,而荧光定量 PCR 则可以直观、实时地观察到结果,同时灵敏性也大大提高,因此实时荧光定量 PCR 成为了当下实验室研究中的热门检测方法^[15]。本实验通过 MS 的 MS 0151 作为靶标,设计特异性引物和探针,以分离株 MS 0801 的基因组为模板,通过优化最佳退火温度和探针引物浓度,建立了 MS 的荧光定量 PCR 方法。Raviv 等^[16]利用 MS ISRb 基因建立了 MS 单重探针 qPCR 检测方法,灵敏性为 10 copies/ μ L。Sprygin 等^[17]利用 MG mgc2 和 MS vlha 基因建立了双重探针 qPCR 方法,其灵敏性仅仅为 34 copies/ μ L 和 29 copies/ μ L。本研究建立的荧光定量 PCR 方法灵敏度达到 24.9 copies/ μ L,说明该方法有较高的灵敏度,而组内、组间重复性均小于 2%,说明该方法具有较好的可重复性。本实验建立 MS 攻毒模型,使用建立的荧光定量 PCR 方法检测 MS 感染后鸡血液的载菌量,

从而对 MS 在感染鸡只体内的增殖动态变化进行监测,为 MS 的及早诊断奠定基础。检测结果显示 MS 在感染鸡血液内呈现先增殖后消减再增殖再消减的动态变化,符合机体对入侵病原体的免疫防御及免疫逃逸后进一步增殖的一般规律。

可靠的攻毒模型需要具有良好的攻毒效果。攻毒效果受攻毒毒株、攻毒方式和攻毒剂量三方面的影响:(1) 各实验室保存的不同菌株毒力存在差异,攻毒效果便存在差异,毒力弱的毒株攻毒后发病率较低,攻毒效果不佳。(2) 不同攻毒方式所产生的感染效果存在差异。(3) 攻毒剂量不同同样影响攻毒效果,攻毒剂量过低,则发病率过低,攻毒剂量过高,则后续进行疫苗免疫评价时疫苗保护率过低^[18]。本试验中使用毒力相对较强的 MS 0801 菌株,选择适当的攻毒剂量,选用滴鼻攻毒和足垫攻毒两种攻毒方式,建立了两种攻毒模型。结果表明,足垫攻毒组 MS 在血液中的增殖要快于滴鼻攻毒组。

关于免疫效果评价方法,目前一般使用临床病变评分和发病比例来评价。尹丽萍等^[19]使用鸡只临床病变评分和爪垫肿胀鸡只比例来评价;马爽等^[20]使用鸡只发病比例来评价。这些方法主观性强、误差较大,判断结果不够准确。本实验使用 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对 MS 感染鸡只血液载菌量的检测,为疫苗免疫评价方法提供了新的思路,或许可以通过检测已免疫鸡只感染 MS 后血液载菌量的变化,与未免疫鸡只进行比较,从而评价疫苗的保护效果。

4 结论

通过对滑液囊支原体的保守基因 MS 0151 序列设计特异性引物和探针,本实验建立了一种能够快速检测 MS 的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法,其扩增曲线具有良好的线性关系,特异性

良好,检测下限为 25 copies/ μ L,变异系数均小于 2%。通过建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法检测 MS 在感染鸡血液内的动态增殖变化,为临床上检测 MS 感染提供了技术支撑,为疫苗免疫评价方法提供了新思路,为滑液囊支原体疾病的防治和净化奠定了基础。

REFERENCES

- [1] RAZIN S, YOGEV D, NAOT Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(4): 1094-1156.
- [2] POVEDA JB, CARRANZA J, MIRANDA A, GARRIDO A, HERMOSO M, FERNANDEZ A, DOMENECH J. An epizootiological study of avian mycoplasmas in Southern Spain[J]. Avian Pathology: Journal of the W V P A, 1990, 19(4): 627-633.
- [3] 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.
- [4] 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(1): 115.
- [5] WU ZY, DING LJ, BAO JX, LIU YH, ZHANG QM, WANG J, LI R, ISHFAQ M, LI JC. Co-infection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Escherichia coli* triggers inflammatory injury involving the IL-17 signaling pathway[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2615.
- [6] SUN SK, LIN X, LIU JM, TIAN ZQ, CHEN F, CAO YC, QIN JP, LUO TR. Phylogenetic and pathogenic analysis of *Mycoplasma Synoviae* isolated from native chicken breeds in China[J]. Poultry Science, 2017, 96(7): 2057-2063.
- [7] KORDAFSHARI S, MAREDA MS, AGNEW R, SHIL P, SHAHID MA, MARTH C, KONSAK BM, NOORMOHAMMADI AH. Complementation of the *Mycoplasma synoviae* MS-H vaccine strain with wild-type *oppF₁* influences its growth characteristics[J]. Avian Pathology: Journal of the W V P A, 2020, 49(3): 275-285.
- [8] JONES JF, WHITHEAR KG, SCOTT PC, NOORMOHAMMADI AH. Onset of immunity with *Mycoplasma synoviae*: comparison of the live attenuated vaccine MS-H (Vaxsafe MS) with its wild-type parent strain (86079/7NS)[J]. Avian Diseases, 2006, 50(1): 82-87.
- [9] GONG XW, CHEN QW, FERGUSON-NOEL N, STIPKOVITS L, SZATHMARY S, LIU YS, ZHENG FY. Evaluation of protective efficacy of inactivated *Mycoplasma synoviae* vaccine with different adjuvants[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2020, 220: 109995.
- [10] 李浩然, 祁晶晶, 王宇, 尚原冰, 王桂军, 于圣青. 滑液支原体 NADH 氧化酶的酶学活性及亚细胞定位研究[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 801-812.
- LI HR, QI JJ, WANG Y, SHANG YB, WANG GJ, YU SQ. Enzymatic activity and subcellular localization analyses of the NADH oxidase in *Mycoplasma synoviae*[J]. Microbiology China, 2020, 47(3): 801-812 (in Chinese).
- [11] 赵艳利, 严常燕, 蒋红霞, 郑煦灿. 滑液囊支原体检测方法研究进展[J]. 中国家禽, 2023, 45(10): 90-96.
- ZHAO YL, YAN CY, JIANG HX, ZHENG XC. Progress in methods for detection of *Mycoplasma synoviae*[J]. Chinese poultry, 2023, 45(10): 90-96 (in Chinese).
- [12] KLEVEN SH. Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry[J]. Avian Diseases, 2008, 52(3): 367-374.
- [13] 江斌, 陈晓华. 鸡滑液囊支原体病的诊断与防控技术[J]. 福建畜牧兽医, 2021, 43(6): 65-67.
- JIANG B, CHEN XH. Diagnosis and control techniques of mycoplasma synovialis in chickens[J]. Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2021, 43(6): 65-67 (in Chinese).
- [14] 钱琳娜, 萨茹丽, 许哲峰, 李岩, 张帆, 宋越, 宋爱军, 陈伟, 毕力格巴图, 赵世华, 杨斌. 鸡毒支原体鸡滑液囊支原体和副鸡禽杆菌三重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2020, 50(3): 314-320.
- QIAN LN, SA RL, XU ZF, LI Y, ZHANG F, SONG Y, SONG AJ, CHEN W, Biligebatu, ZHAO SH, YANG B. Establishment of a triple PCR for the detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Avibacterium paragallinarum*[J]. Chinese Veterinary Science, 2020, 50(3): 314-320 (in Chinese).
- [15] 肖国生, 曹三杰, 文心田. 荧光定量 PCR 技术及其在动物传染病定量检测中的应用[J]. 动物医学进展, 2005, 26(2): 13-17.
- XIAO GS, CAO SJ, WEN XT. Fluorescent quantitative PCR and its applications in diagnosing animal infectious diseases[J]. Progress In Veterinary Medicine, 2005, 26(2): 13-17.

- 2005, 26(2): 13-17 (in Chinese).
- [16] RAVIV Z, KLEVEN SH. The development of diagnostic real-time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian mycoplasmas[J]. Avian Diseases, 2009, 53(1): 103-107.
- [17] 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.
- [18] 丁美娟, 周勇岐, 张小飞, 卢凤英, 许秀梅, 汪爱芬, 尹秀凤. 鸡滑液囊支原体病药物治疗与疫苗免疫及两种方法联合比较试验[J]. 中国家禽, 2019, 41(14): 73-75.
- DING MJ, ZHOU YQ, ZHANG XF, LU FY, XU XM, WANG AF, YIN XF. Efficacy comparison of drug therapy, vaccine immunization and its combination against *Mycoplasma synoviae* infection in chicken[J]. China Poultry, 2019, 41(14): 73-75 (in Chinese).
- [19] 尹丽萍, 王建, 李昌明, 王莉, 张凯云, 姜平, 秦爱建, 刘岳龙. 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.
- YIN LP, WANG J, LI CM, WANG L, ZHANG KY, JIANG P, QIN AJ, LIU YL. Establishment of chicken *Mycoplasma synoviae* challenge model and evaluation of immune effect of inactivated vaccine[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2023, 59(8): 67-71 (in Chinese).
- [20] 马爽, 范根成, 孙健, 程增青, 赵鹏, 胡潇, 郭莉莉, 刘蕾, 徐保娟, 王龙. 一种鸡滑液囊支原体: CN105733987A[P]. 2016-07-06.
- MA S, FAN GC, SUN J, CHENG ZQ, ZHAO P, HU X, GUO LL, LIU L, XU BJ, WANG L. *Mycoplasma synoviae*: CN105733987A[P]. 2016-07-06 (in Chinese).