

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.03.03

一株猪肺炎支原体的分离鉴定

潘建刚, 陈 波, 周明光, 徐高原*

(武汉科前生物股份有限公司, 武汉 430070)

[收稿日期] 2018-12-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 03-0013-07 [中图分类号] S852.62

[摘 要] 从全国部分猪场采集到疑似猪支原体肺炎肺组织病料 12 份, 提取 DNA 进行猪肺炎支原体 PCR 和多重 PCR 检测, 将病料研磨后分离猪肺炎支原体, 最终分离到 1 株疑似猪肺炎支原体; 通过测序分析、形态观察、生化试验、血清学试验证实其为猪肺炎支原体。该菌株能适应人工培养基的培养, 且传代生长良好, 液体培养基中培养活菌滴度达 10^9 CCU/mL; 菌株有一定的致病性, 免疫原性好, 可作为疫苗备用菌株, 该菌株的分离鉴定为研制猪支原体肺炎疫苗奠定了基础。

[关键词] 猪肺炎支原体; 分离; 鉴定

Isolation and Identification of a Strain of *Mycoplasma hyopneumoniae*

PAN Jian-gang, CHEN Bo, ZHOU Ming-guang, XU Gao-yuan*

(Wuhan Keqian Biology Co Ltd, Wuhan 430070, China)

Corresponding author: XU Gao-Yuan, E-mail: KQyanfa@163.com

Abstract: Twelve lung samples from pigs with suspected infection by *Mycoplasma hyopneumoniae* were collected from some pig farms in the country. DNA was extracted for *Mycoplasma hyopneumoniae* PCR and multiplex PCR, and the *Mycoplasma hyopneumoniae* was isolated after grinding the disease material, and finally a suspected *Mycoplasma hyopneumoniae* was isolated. According to the results of sequencing, morphological observation, biochemical characteristics detection and serological test, The isolate strain was identified as *Mycoplasma hyopneumoniae*. The strain can adapt to the culture of artificial synthetic medium, viable count reached 10^9 CCU/mL. The animal test showed that the isolated strain could cause typical clinical syndrome of mycoplasmal pneumonia; immunogenicity test showed that the strains had good immunogenicity, and provided the necessary condition for mycoplasmal pneumonia of swine vaccine research.

Key words: *Mycoplasma hyopneumoniae*; isolation; identification

猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp) 是引起猪气喘病的主要病原^[1], 该病在世界范围内广泛流行, 我国地方猪种和杂交猪种尤为易

感, 几乎普遍存在, 造成了重大损失。猪群一旦感染 Mhp, 便难以清除^[2], 可继发感染 PRRSV、PCV2 等^[3-4], 从而导致多种疫苗接种失败。由于猪肺炎

作者简介: 潘建刚, 硕士; 从事动物疫苗研发工作。

通讯作者: 徐高原。E-mail: KQyanfa@163.com

支原体对营养要求苛刻,使得其体外分离培养难度很大^[5-6];同时在分离过程中还易受猪鼻支原体(*Mycoplasma hyorhinis*, Mhr)的影响^[7],给本病的研究工作带来了困难。本试验从全国部分猪场采集到的疑似猪支原体肺炎病变肺脏中成功分离获得 1 株猪肺炎支原体,以期猪支原体肺炎疫苗的研究提供必要条件和有利数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料来源 疑似猪支原体肺炎的发病猪肺脏采集自全国部分猪场,肺脏的尖叶、心叶、中间叶或膈叶前缘有不同程度的对称性病变,呈“肉样变”、“胰样变”,共 12 份。

1.1.2 猪肺炎支原体培养基 由武汉科前生物股份有限公司制备。

1.1.3 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 购于北京庄盟国际生物基因科技有限公司。

1.1.4 试验动物 3 周龄仔猪,购自华农试验种猪场,母猪未注射猪支原体肺炎疫苗,经 IDEXX 试剂盒检测仔猪血清中猪肺炎支原体(Mhp)、猪圆环病毒(PCV2)、猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(PRRSV)抗体阴性。

1.1.5 猪肺炎支原体阳性血清 本实验室从北京生泰尔生物科技有限公司购进的猪肺炎支原体 J 株制备兔抗猪肺炎支原体特异性血清,琼扩效价为 1:32,批号为 170502。

1.1.6 猪鼻支原体阳性血清 从中国兽医药品监察所菌种保藏中心购进的猪鼻支原体 BTS-7 株制备兔抗猪鼻支原体特异性血清,琼扩效价为 1:16,批号为 170301。

1.1.7 攻毒用强毒株 猪肺炎支原体(济南系强毒 CVCC354 株),F3 代,由武汉科前股份有限公司复壮、保管和供应。

1.2 方法

1.2.1 病料采集 将采集的 12 份病料分别用含 800 U/mL 青霉素的 PBS 洗去血液和组织碎片,无菌操作剪取有猪喘气病特征病变和将健康交界处的肺组织进行 PCR 鉴定和供分离培养。

1.2.2 病料 PCR 鉴定

1.2.2.1 病料 DNA 提取 取约 0.5 g 病料,剪碎后匀浆器加 2.0 mL 水研磨成糊状,先 3000 r/min 离心 5 min,上清再以 13000 r/min 离心 20 min,弃上清,沉淀用 250 μ L PBS 重悬。用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取重悬液 DNA, -20 $^{\circ}$ C 以下保存备用。

1.2.2.2 PCR 鉴定 PCR 引物按参考文献方法进行合成^[8]。猪肺炎支原体引物序列:P1:5'-TTA-CAGCGGAAGACC-3';P2:5'-CGGCGAGAACTG-GATA-3';PCR 扩增体系:10 $\times$ buffer 5.0 μ L, dNTP (2.5 mmol/L)4.0 μ L,引物 P1(10 μ M)1.0 μ L,引物 P2(10 μ mol/L)1.0 μ L,模板 DNA 2.0 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L)0.25 μ L,加注射用水至 50 μ L;反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。预计扩增片段长度约为 427 bp。

1.2.2.3 多重 PCR 鉴定 多重 PCR 引物按参考文献方法进行合成^[9-10],引物序列:Mhp-f:5'-TTCAAAGGAGCCTTCAAGCTTC-3';Mhr-f:5'-CGGGATGTAGCAATACATTTCAG-3';M-r:5'-AGAGGCATGATGATTTGACGTC-3';多重扩增体系:10 $\times$ buffer 5.0 μ L, dNTP (2.5 mmol/L)4.0 μ L,上游引物均为 (10 μ mol/L)0.8 μ L,下游引物为 (10 μ mol/L)1.2 μ L,模板 DNA 2.0 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L)0.25 μ L,加注射用水至 50 μ L;反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。预计猪肺炎支原体扩增片段长度约为 1000 bp;猪鼻支原体扩增片段长度约为 1129 bp。

1.2.3 病原的分离 将病料研磨后过滤,接入含 10%猪鼻支原体特异性血清、800 U/mL 青霉素的猪肺炎支原体液体培养基中,置 37 $^{\circ}$ C 培养。每间隔 7 日盲传 1 次,每天观察培养基颜色变化,前 3 代均加入 10%猪鼻支原体特异性血清。在培养时,将培养基颜色发生改变,传代可出现 pH 规律性下降的培养菌液进行鉴定,剩余培养菌液于 -20 $^{\circ}$ C 以

下冻存。

1.2.4 病原的 PCR 鉴定及测序 将经培养传代分离的菌株提取基因组 DNA,按 1.2.2.2 方法进行 PCR 扩增,扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳。回收产物送往擎科公司测序。

1.2.5 形态观察 按常规方法对分离菌株进行瑞氏染色,普通光学显微镜下观察菌体形态特征。

1.2.6 生化特性 将临床分离株进行尿素酶活性测定;葡萄糖分解试验;精氨酸水解试验;三苯基氯化四氮唑(TTC)试验;七叶苷水解试验;甘露醇分解试验;膜和斑形成试验。生化实验按参考文献^[11]方法进行。

1.2.7 血清学特性 生长抑制试验:将直径为 6 mm的圆形滤纸片用未经稀释的抗血清浸泡后放入无菌平板内,4 ℃干燥待用。吸取待检菌株的菌液 0.1 mL 涂布于固体平皿中,放置 37 ℃使琼脂表面稍干燥,无菌夹取抗血清滤纸片贴于琼脂表面,37 ℃培养 10 日。在低倍显微镜下观察,当滤纸片周围无菌落生长,出现抑制带大于 1.0 mm 时,判为猪肺炎支原体阳性。

1.2.8 致病性分析 将分离菌株菌液分别经气管注射 3 周龄仔猪 4 头,5 mL/头(10⁹ CCU)。另设 4 头条件相同的对照猪,各气管注射培养基 5 mL,作为对照。试验猪、对照猪隔离饲养。每天观察发病情况,并于注射后 28 d 全部剖杀,观察肺部病变,根据 Goodwin 氏 55 分评分法对试验仔猪的肺脏病变进行打分^[12]。取部分病变组织置于 10%的甲醛溶液固定,随后进行石蜡包埋、切片和 HE 染色等一系列病理切片制作流程后,在显微镜下读片,观察组织病理变化,了解菌株对仔猪的毒力,记录试验结果。

1.2.9 免疫原性试验 将分离株菌株浓缩纯化、灭活后与佐剂混合制备灭活疫苗,将疫苗分别颈部肌肉注射 3 周龄仔猪 4 头,2.0 mL/头(10⁹ CCU),接种后 21 d,按相同途径、相同剂量二免。另外 4 头不接种作为对照,同条件下饲养。二免 14 d,连同对照猪 4 头,各气管注射猪肺炎支原体(济南系强毒 CVCC354 株)冻干肺组织毒 5 mL(含 0.5 g 病肺组织),每日观察仔猪临床症状,攻毒后 28 d,扑杀全部仔猪。按 55 分法对各仔猪的肺部喘气病病变进行评分,计算肺炎病变减少率。

2 结果

2.1 病料 PCR 鉴定 12 份病料,其中 4 份病料检测出有猪肺炎支原体(图 1)。

M: DL2000 DNA Marker; 1: 阳性对照;
2: 阴性对照; 3-14: 病料样品

M: DL2000 DNA Marker; 1: Positive control;
2: Negative control; 3-14: Tissue samples

图 1 肺组织 PCR 检测结果

Fig 1 PCR results for the lung tissues

2.2 病料多重 PCR 鉴定 4 份阳性病料经过多重 PCR 检测都能扩增出长度约为 1000 bp 猪肺炎支原体目的片段,但其中有 3 份阳性病料还扩增出长度约为 1129 bp 猪鼻支原体目的片段(图 2)。

M: DL2000 DNA Marker; 1: 阴性对照;
2: 猪鼻支原体阳性对照; 3: 猪肺炎支原体阳性对照;
4: 猪鼻支原体阳性对照、猪肺炎支原体阳性对照; 5-8: 病料样品

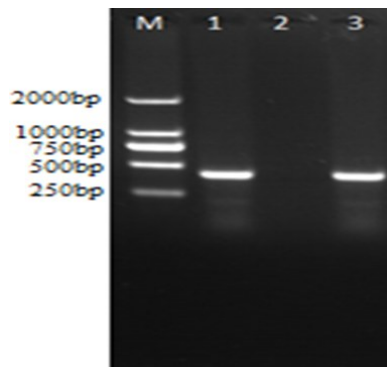
M: DL2000 DNA Marker; 1: Negative control;
2: Positive control(Mhr); 3: Positive control (Mhp);
4: Positive control (Mhr、Mhp); 5-8: Tissue samples

图 2 阳性病料多重 PCR 检测结果

Fig 2 Multiple PCR results for the positive samples

2.3 病原分离 取只含有猪肺炎支原体的 1 份病料,研磨后进行分离、培养传代,传至第 3 代时,培养基颜色发生改变,接着传至第 8 代,菌种能在培养基上稳定生长,pH 规律性下降,生长时间稳定在 3~4 d,活菌滴度可达 10^9 CCU/mL。

2.4 病原 PCR 鉴定 菌株扩增结果与预期片段 427 bp 大小一致(图 3)。测序结果通过 NCBI BLAST 比对,分离株 P36 基因序列与猪肺炎支原体 J 株和 168 株同源性分别达 99% 以上,从分子水平上证明了分离的菌株为猪肺炎支原体。



M: DL2000 DNA Marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: 分离菌株
M: DL2000 DNA Marker; 1: Positive control;
2: Negative control; 3: Isolated strain

图 3 菌液 PCR 检测结果

Fig 3 PCR results for the bacterial fluid

2.5 形态学特性 分离猪肺炎支原体菌株经过瑞士染色,镜检,观察到特征性的多形态,有点状、环状、球状和两极状(图 4)。

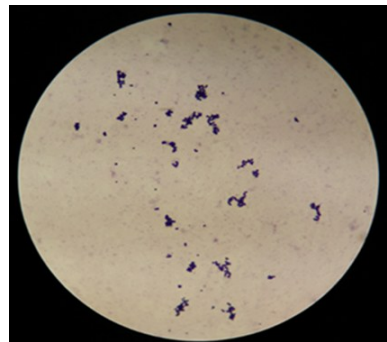


图 4 瑞士染色结果(100×)

Fig 4 The results of wright's stain(100×)

2.6 生化特性 分离菌株生化反应与猪肺炎支原体生化特性相符(表 1)。

表 1 分离菌株生化试验

Tab 1 The biochemical tests of isolated strain		
鉴定项目	标准菌株	分离菌株
尿素酶活性测定	-	-
葡萄糖分解试验	+	+
精氨酸水解试验	-	-
TTC 还原试验	-	-
七叶甙水解试验	+	+
甘露醇分解试验	+	+
膜和斑形成试验	-	-
结果	猪肺炎支原体	猪肺炎支原体
“+” 阳性;“-” 阴性		
“+” Positive;“-” Negative		

2.7 生长抑制 吸有抗血清的滤纸片周围出现了直径为 2.6 mm 的抑菌圈,验证分离的菌株为猪肺炎支原体。

2.8 致病性 攻毒组猪气管内注射 5 mL 分离株菌液后,大部分猪出现咳嗽、喘气等临床症状,对照组无症状(表 2);剖检攻毒猪,发现肺脏的尖叶、心叶前端有部分对称性的肉样变化(02 号和 04 号攻毒猪肺脏如图 5 所示);攻毒组猪肺脏病变组织制片经过 HE 染色后,在显微镜下观察,肺间质增宽、增厚,肺泡内有大量炎性细胞浸润(02 号和 04 号攻毒猪肺脏病变组织切片如图 6 所示),以上说明分离的猪肺炎支原体具有一定的致病性。

2.9 免疫原性 免疫组猪临床观察基本正常,对照组猪有支原体肺炎典型咳嗽、喘气的临床症状,根据肺炎病变打分,免疫组平均肺炎病变减少 74.51%(表 3);剖检试验猪,免疫组和对照组肺部有明显差异,免疫组猪肺组织病变不明显,对照组病变严重,肺脏的尖叶、心叶前缘有严重的对称性病变,呈“肉样变”、“胰样变”(12 号免疫组猪,18 号对照组猪肺脏如图 7),以上说明分离的猪肺炎支原体具有很好的免疫原性。

表 2 临床症状和肺病变得分结果

Tab 2 The clinical manifestation and score of pathologe variation of piglets lung

组别	耳号	临床症状观察	肺部病变评分	平均肺部病变评分
攻毒组	01	无咳嗽、喘气等症状	3	6.0
	02	攻毒后 15 天出现轻微咳嗽、喘气	10	
	03	攻毒后 20 天后偶尔出现轻微咳嗽	3	
	04	攻毒后 18 天出现轻微咳嗽、喘气	8	
对照组	05	无咳嗽、喘气等症状	0	0
	06	无咳嗽、喘气等症状	0	
	07	无咳嗽、喘气等症状	0	
	08	无咳嗽、喘气等症状	0	

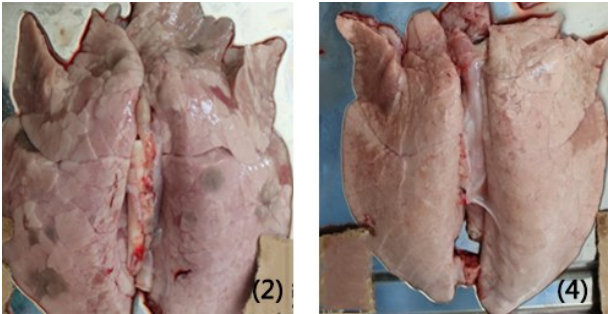


图 5 肺脏临床解剖图
Fig 5 Clinical anatomy of lung

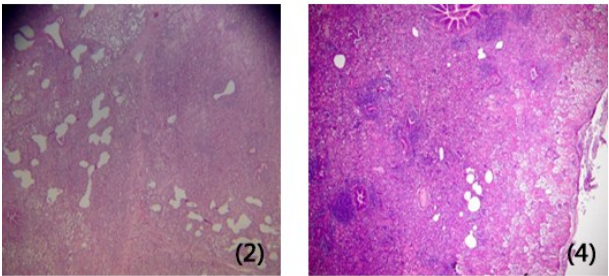


图 6 肺脏病理切片观察 (HE 40×)
Fig 6 Observed of pathophysiology of lung (HE 40×)

表 3 临床症状和攻毒保护结果

Tab 3 The results of clinical manifestation and attack protection

组别	耳号	临床症状	肺炎病变得分	肺部病变平均得分	平均肺部病变减少率
免疫组	11	攻毒后 22 天出现轻微咳嗽	6	3.25	74.51%
	12	无咳嗽、喘气等症状	3		
	13	无咳嗽、喘气等症状	0		
	14	无咳嗽、喘气等症状	4		
对照组	15	攻毒后 20 天出现轻微咳嗽	10	12.75	-
	16	攻毒后 21 天出现轻微咳嗽	7		
	17	攻毒后 16 天出现咳嗽、喘气	16		
	18	攻毒后 15 天出现咳嗽、喘气	18		

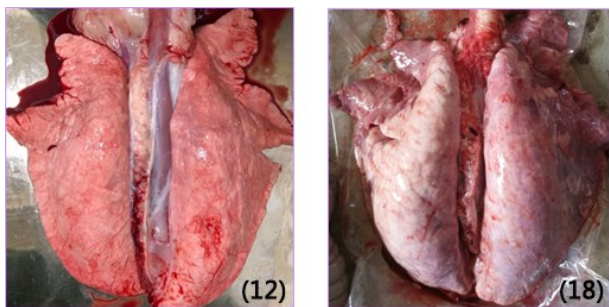


图 7 肺脏临床解剖图

Fig 7 Clinical anatomy of lung

3 讨论与结论

猪肺炎支原体感染猪时,常伴有猪鼻支原体混合感染,从猪体内进行猪肺炎支原体的分离非常困难。现有疫苗菌株分离年代都比较久远,保护效果有一定的降低。本研究通过采集疑似猪支原体感染的组织病料,经过 PCR 鉴定,多重 PCR 检测,将阳性病料接到猪肺炎支原体液体培养基进行分离,成功分离到一株菌株。分离的菌株经测序、形态观察、生化特性、血清学特性鉴定为猪肺炎支原体,此株猪肺炎支原体与常用的疫苗菌株同源性好,并且是从最近发病的猪场分离而来,为潜在的疫苗菌株。

在致病性试验中,分离菌株菌液进行攻毒,发现分离菌株经过传代仍具有一定的毒力,可致仔猪产生咳嗽等支原体肺炎典型的临床症状,剖检能观察到肺部肉变,病理切片显示感染猪均表现不同程度的间质性肺炎;在免疫原性试验中,分离株制备灭活疫苗免疫仔猪后攻毒,免疫组肺炎病变平均减少 74.51%,分离菌株免疫原性良好。对仔猪的致病性试验和免疫原性试验可以证明,分离株适合作为灭活疫苗的制苗用菌株。

参考文献:

[1] 王 华, 张 清, 王君玮, 等. 猪支原体肺炎流行病学和诊断技术研究进展[J]. 动物医学进展, 2009, 30(9):73-77.
Wang H, Zhang Q, Wang J W, et al. Progress on epidemiology and diagnostic techniques of mycoplasmal pneumonia of swine [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2009, 30(9):73-77.

[2] 沈青春, 宁宜宝, 覃青松. 猪肺炎支原体的研究进展[J]. 中

国兽药杂志, 2003, 37(6):26-30.

Shen Q C, Ning Y B, Tan Q S. The progress of prevention and cure on swine *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2003, 37(6):26-30.

[3] Pieters M, Pijoan C, Fano E, et al. An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs [J]. Veterinary Microbiology, 2009, 134(3):261-266.

[4] 车艳杰, 于 霏, 高玉梅, 等. 猪肺炎支原体 DJ-166 株的分离鉴定[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(3):6-10.
Che Y J, Yu F, Gao Y M, et al. Isolation and identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* DJ-166 strain [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(3):6-10.

[5] 韦艳娜, 白 昀, 孔 猛, 等. 猪肺炎支原体的分离方法[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(1):104-107.
Wei Y N, Bai Y, Sun M, et al. Ways to isolate *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2012, 28(1):104-107.

[6] 陈祝三, 陈竹兰, 陈廷和, 等. 从冻结和冻干病肺中分离猪肺炎支原体的试验[J]. 中国预防兽医学报, 1981(4):19-21.
Chen Z S, Chen Z L, Chen T H, et al. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from frozen and freeze-dried lungs [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 1981(4):19-21.

[7] Vicca J, Stakenborg T, Maes D, et al. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*, field isolates [J]. Veterinary Microbiology, 2003, 97(3):177-190.

[8] 刘茂军, 张 映, 邵国青, 等. 猪支原体肺炎可疑肺组织 PCR 检测方法的建立[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2009, 29(5):444-447.
Liu M J, Zhang Y, Shao G Q, et al. Establishment of PCR method for detecting the suspicious sample of *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Nature Science Edition), 2009, 29(5):444-447.

[9] 刘茂军, 王占伟, 韦艳娜, 等. 猪肺炎支原体和猪鼻支原体双重 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(9):7-10.
Liu M J, Wang Z W, Wei Y N, et al. Establishment and application of double PCR method for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2012, 46(9):7-10.

[10] Stakenborg T, Vicca J, Butaye P, et al. A multiplex PCR to identify porcine *Mycoplasmas* present in broth cultures [J]. Veterinary Research Communications, 2006, 30(3):239-247.

[11] 廖永洪, 张许科, 孙进忠, 等. 一株猪肺炎支原体 HN0613 株的分离鉴定[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(3):4-6.

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.03.04

沙门氏菌类活疫苗活菌计数参考疫苗的研究

王秀丽¹, 张媛¹, 李红霞², 袁露², 李爱玲³, 曹翠萍³,
刘博¹, 辛凌翔¹, 彭国瑞¹, 李建¹, 蒋玉文^{1*}

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2. 齐鲁动物保健品有限公司, 济南 250100; 3. 辽宁益康生物股份有限公司, 辽宁辽阳 111000)

[收稿日期] 2018-12-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 03-0019-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为研制沙门氏菌类活疫苗活菌计数的参考疫苗, 以期更科学地评价活菌计数结果的有效性, 研究制备了一批仔猪副伤寒活疫苗作为参考疫苗候选物, 对其性状、纯粹检验、真空度、剩余水分进行检测, 对其运输稳定性、均一性进行测定, 组织协作标定对参考疫苗候选物进行赋值, 用协作标定的方法统计参考疫苗候选物在 18 个月的保存期, 将参考疫苗初步应用于仔猪副伤寒活疫苗活菌计数的检验。结果表明, 参考疫苗的性状、纯粹检验、剩余水分和真空度测定均符合《中国兽药典》的规定, 均一性试验结果显示 10 瓶参考疫苗候选物计数结果的变异系数小于 10%, 说明其均一性良好。协作标定统计出参考疫苗候选物的赋值范围为 $(3.0, 4.0) \times 10^9$ CFU/头份, 保存期试验结果显示参考疫苗候选物在 -70℃ 以下保存 18 个月菌数稳定。参考疫苗的初步应用显示本参考疫苗不仅可以为沙门氏菌类活疫苗活菌计数提供参照物, 而且还可用于控制普通琼脂培养基的质量。

[关键词] 参考疫苗; 活菌计数; 沙门氏菌活疫苗

Study on Reference Vaccine for Bacterial Plate Count of *Salmonella* Vaccines

WANG Xiu-li¹, ZHANG Yuan¹, LI Hong-xia², YUAN Lu², LI Ai-ling³, CAO Cui-ping³,
LIU Bo¹, XIN Ling-xiang¹, PENG Guo-rui¹, LI Jian¹, JIANG Yu-wen^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Qilu Animal Health Products Co., Ltd, Jinan 250100, China;

3. Liaoning Yikang Biological Co., Ltd, Liaoyang, Liaoning 111000, China)

Corresponding author: JIANG Yu-wen, E-mail: 2312387082@qq.com

Abstract: A batch of paratyphus live vaccines for piglets was produced as the candidate for the bacterial plate count reference vaccine on salmonella vaccines, in order to evaluate the test result of the bacterial plate count more

基金项目: 国家重点研发计划“兽用生物制品及检测试剂质量评价标准研究”(2017YFF0208600)

作者简介: 王秀丽, 硕士, 从事细菌类生物制品的检验及检测技术研究。

通讯作者: 蒋玉文。E-mail: 2312387082@qq.com

Liao Y H, Zhang X K, Sun J Z, et al. Isolation and identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain HN0613 [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2013, 47(3): 4-6.

experiments relating to artificial immunity in enzootic pneumonia of pigs[J]. Journal of Hygiene, 1969, 67(3): 465-476.