

不同水性及水包油型佐剂对猪支原体肺炎灭活疫苗的免疫增强作用

解海东^{1,2}, 熊祺琰¹, 刘茂军¹, 韦艳娜¹, 王佳¹, 宁官保², 邵国青^{1*}

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所, 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室
国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014; 2. 山西农业大学 动物科技学院, 太谷 030801)

摘要: 旨在为猪支原体肺炎灭活疫苗研发水性的或水包油型佐剂, 降低疫苗的副作用。利用小鼠为模型动物评价几种不同佐剂配合猪支原体肺炎灭活疫苗免疫动物时对细胞免疫和体液免疫应答的增强作用。将不同佐剂与灭活疫苗配合肌肉注射免疫小鼠, 检测脾淋巴细胞对猪肺炎支原体抗原的增殖应答情况及特异性的血清 IgG 抗体水平。试验分两批次进行, 共评价 11 种佐剂。结果表明, 卡波姆₉₇₄ + 免疫刺激复合物基质混合物佐剂和壳聚糖 + 左旋咪唑混合物佐剂强烈地诱导产生高水平细胞免疫和体液免疫应答 ($P < 0.01$); 卡波姆₉₇₄ + 左旋咪唑混合物佐剂、卡波姆₉₇₄ + 左旋咪唑 + 黄芪多糖混合物佐剂和 ISA 11R VG 佐剂次之 ($P < 0.05$); β -葡聚糖 + 左旋咪唑混合物佐剂、DEAE-dextran + 左旋咪唑 + 黄芪多糖混合物佐剂和 β -葡聚糖 + 左旋咪唑 + 黄芪多糖混合物佐剂在细胞免疫应答方面作用显著 ($P < 0.01$), 但体液免疫应答作用稍弱; 而 GEL 01 ST 佐剂在体液免疫应答方面作用显著 ($P < 0.01$), 细胞免疫应答作用稍弱。通过分析认为卡波姆₉₇₄ + 免疫刺激复合物基质混合物佐剂、壳聚糖 + 左旋咪唑混合物佐剂的效果最好, 可同时显著增加细胞及体液免疫应答, 本试验结果将为猪支原体肺炎灭活疫苗的佐剂研发提供数据基础。

关键词: 水性佐剂; 水包油佐剂; 猪支原体肺炎灭活疫苗; 细胞免疫; 体液免疫

中图分类号: S852.4

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)12-2028-06

Study on Immune Enhancement Effect of Different Aqueous and Oil-in-water Adjuvants to the *Mycoplasma hyopneumoniae* Inactivated Vaccine

XIE Hai-dong^{1,2}, XIONG Qi-yan¹, LIU Mao-jun¹, WEI Yan-na¹,
WANG Jia¹, NING Guan-bao², SHAO Guo-qing^{1*}

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China;
2. College of Animal Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: The purpose of this study was to develop a novel aqueous or oil-in-water adjuvant for the *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivated vaccine as well as to reduce the side effect of the vaccine. The Kunming mice were used as the animal model to evaluate the immune enhancement effect of different adjuvants to the inactivated vaccine. After immunization, the response of lymphocyte proliferation and the production of serum antibody IgG were evaluated. The experiments were carried out as two individual parts and 11 kinds of adjuvants were tested in total. The results indicated that the carbomer₉₇₄ + ISCOM-matrix mixture adjuvant and the chitosan + levamisole

收稿日期: 2014-03-24

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目(cx(13)3066)

作者简介: 解海东(1988-), 男, 郸城县人, 硕士生, 主要从事动物疫苗方面研究, E-mail: xhdxhxfy.happy@163.com

* 通信作者: 邵国青, 研究员, E-mail: gqshaonj@163.com, Tel: 025-84391973

mixture adjuvant strongly induced high levels of cellular immune and humoral immune response, better than the effect of the carbomer₉₇₄ + levamisole mixture adjuvant, the carbomer₉₇₄ + levamisole + astragalus polysaccharides mixture adjuvant and the ISA 11R VG adjuvant. Animals of the groups of the beta- glucan + levamisole mixture adjuvant, the DEAE-dextran + levamisole + astragalus polysaccharide mixture adjuvant and the beta- glucan + levamisole + astragalus polysaccharide mixture adjuvant had obvious cellular immune response, but weak humoral immune response. Additionally, animals of the group of the GEL 01 ST adjuvant had obvious humoral immune response, but weak cellular immune response. The carbomer₉₇₄ + ISCOM-matrix mixture adjuvant and the chitosan + levamisole mixture adjuvant had the best effect on both cellular and humoral immune response. This data would help in the subsequent research on the inactivated vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Key words: aqueous adjuvant; oil-in-water adjuvants; *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivated vaccine; cellular immune response; humoral immune response

猪支原体肺炎 (*Mycoplasma pneumoniae* of Swine, MPS) 又称为猪气喘病, 是一种由猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp) 感染引起的一种接触性、慢性呼吸道传染病, 也是一种重要的免疫抑制性疾病, 是猪呼吸道综合征的病原之一; 主要临床症状为咳嗽和气喘, 病变特征主要为肺的心叶、尖叶、膈叶出现对称性的“肉样”实变。易继发链球菌、巴氏杆菌和肺炎球菌等感染, 该病药物治疗效果并不理想, 因而疫苗接种是预防该病的有效手段^[1]。目前市场上猪支原体肺炎灭活疫苗以进口产品为主, 以美国辉瑞动物保健品公司生产的“瑞倍适[®]”灭活疫苗应用较为广泛。但由于国外猪支原体肺炎灭活苗价格昂贵, 难以在中国猪场推广。国内厂家生产的猪支原体肺炎灭活苗价格较国外便宜, 但目前中国国内猪支原体肺炎灭活苗主要是以油包水的佐剂为体系制备成的, 免疫后易造成注射部位炎症, 安全性差^[2], 因此使用水性佐剂或者水为连续相的乳剂型佐剂替代传统的油包水型佐剂是该疫苗研制的新方向。本试验就几种不同的水性及水包油型佐剂对猪支原体肺炎灭活疫苗的免疫增强作用进行了评价。免疫小鼠后, 评价其细胞免疫和体液免疫, 初步筛选出较好的佐剂配方, 为后续的本动物免疫试验提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 佐剂材料 黄芪多糖粉末购自陕西锦泰生物工程有限公司, 纯度 > 70%; 左旋咪唑粉末购自 Sigma 公司, 纯度 ≥ 99%; 免疫刺激复合物基质 (im-

munostimulating complex matrix, ISCOM-matrix) 为自制^[3], 主要成分是 Quil A、磷脂和胆固醇, 其中免疫刺激复合物基质浓度用其中 Quil A 的浓度表示; 卡波姆 974P、971P 为美国路博润公司产品; GEL 01 ST、ISA 11R VG 均为 SEPPIC 公司产品; 壳聚糖 I1008-1 为 Fluka 公司产品; DEAE-Dextran 为 pharmacia 公司产品; β-葡聚糖购自陕西慈缘生物技术有限公司。

1.1.2 疫苗抗原 猪肺炎支原体 (NJ 株) 灭活抗原, 批号 20111104, 支原体浓度为 10^9 ccu · mL⁻¹; 由江苏省农业科学院兽医所家畜疫病防控研究室自制。

1.1.3 实验动物 18~20 g 的雄性昆明小鼠共 180 只 (两批次试验), 4 周龄, 购自扬州大学比较医学中心。

1.2 小 鼠 免 疫

第一批次试验: 将小鼠随机分成 8 组, 每组 12 只, G1 组为阴性对照组, 不免疫; G2~G8 组分别免疫含不同佐剂的灭活疫苗 (表 1)。第二批次试验: 将小鼠随机分成 6 组, 每组 12 只, G9 组为阴性对照组, 不免疫; G10~G14 组分别免疫含不同佐剂的灭活疫苗 (表 1)。其中 G7 和 G10 组使用同一佐剂。除 G5 组卡波姆₉₇₄ + 免疫刺激复合物基质混合物佐剂组是将佐剂与疫苗抗原等体积混合 (50 μL 佐剂 + 50 μL 抗原) 外, 其它各组均是按 2 : 1 的体积混合 (100 μL 佐剂 + 50 μL 抗原), 分别后腿肌肉注射免疫。第一次免疫后 14 天进行二次免疫, 免疫剂量同一免。各组具体免疫情况见表 1。

1.3 淋 巴 细 胞 增 殖 反 应 测 定

第二次免疫后第 7 天进行淋巴细胞增殖应答检

表 1 小鼠免疫分组及免疫情况

Table 1 Mice immunized group and immune conditions

试验批次 Batch	组号 Group number	<i>n</i>	组别 Groups	佐剂在疫苗中的终浓度 The final concentration of adjuvant in the vaccine	灭活抗原在疫苗中的 终浓度/(ccu · mL ⁻¹) The final concentration of Inactivated antigen in the vaccine	免疫剂量/ μ L Immunization dose
第一 批次 The 1st batch	G1	10	阴性对照组	—	—	150
	G2	12	卡波姆 ₉₇₄ + 左旋咪唑 混合物佐剂组	卡波姆 ₉₇₄ 0.33% 左旋咪唑 6.67 mg · mL ⁻¹	6.67 × 10 ⁷	150
	G3	12	卡波姆 ₉₇₁ + 左旋咪唑 混合物佐剂组	卡波姆 ₉₇₁ 0.33% 左旋咪唑 6.67 mg · mL ⁻¹	6.67 × 10 ⁷	150
	G4	12	卡波姆 ₉₇₄ + 左旋咪唑 + 黄芪多糖混合物佐剂组	卡波姆 ₉₇₄ 0.33% 左旋咪唑 6.67 mg · mL ⁻¹ 黄芪多糖 66.67 mg · mL ⁻¹	6.67 × 10 ⁷	150
	G5	12	卡波姆 ₉₇₄ + 免疫刺激复合物 基质混合物佐剂组	卡波姆 ₉₇₄ 0.33% ISCOM-maxtrix 83.33 μ g · mL	10 ⁸	100
	G6	12	壳聚糖 + 左旋咪唑 混合物佐剂组	壳聚糖 1% 左旋咪唑 6.67 mg · mL ⁻¹	6.67 × 10 ⁷	150
	G7	12	GEL 01 ST	10%	6.67 × 10 ⁷	150
	G8	12	ISA 11R VG	15%	6.67 × 10 ⁷	150
	G9	10	阴性对照组	—	—	150
	G10	12	GEL 01 ST	10%	6.67 × 10 ⁷	150
第二 批次 The 2nd batch	G11	12	DEAE-Dextran + 左旋咪唑混合物佐剂组	DEAE-Dextran 10% 左旋咪唑 6.67 mg · mL ⁻¹	6.67 × 10 ⁷	150
	G12	12	β -葡聚糖 + 左旋咪唑 混合物佐剂组	β -葡聚糖 6.67 mg · mL ⁻¹ 左旋咪唑 6.67 mg · mL ⁻¹	6.67 × 10 ⁷	150
	G13	12	DEAE-Dextran + 左旋咪唑 + 黄芪多糖混合物佐剂组	DEAE-Dextran 10% 左旋咪唑 6.67 mg · mL ⁻¹ 黄芪多糖 66.67 mg · mL ⁻¹	6.67 × 10 ⁷	150
	G14	12	β -葡聚糖 + 左旋咪唑 + 黄芪多糖混合物佐剂组	β -葡聚糖 6.67 mg · mL ⁻¹ 左旋咪唑 6.67 mg · mL ⁻¹ 黄芪多糖 66.67 mg · mL ⁻¹	6.67 × 10 ⁷	150

测,每组取 4 只小鼠进行。常规方法获得小鼠脾淋巴细胞悬液^[4],用 1640 完全培养基调整细胞数至 $3 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$,把各组淋巴细胞铺在 96 孔细胞板内($100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$),分别加入 PBS、猪肺炎支原体全菌蛋白溶液($5 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$),设 4 个复孔;CO₂ 培养箱培养 72 h,加入 MTT $20 \mu\text{L}$ ^[5],继续孵育 4 h 后,加

入 $150 \mu\text{L}$ DMSO 显色。检测 OD_{490 nm},并按以下公式计算刺激指数(stimulation index, SI):

$$SI = \frac{\text{抗原刺激孔 OD 值} - \text{空白孔 OD 值}}{\text{PBS 刺激孔 OD 值} - \text{空白孔 OD 值}}$$

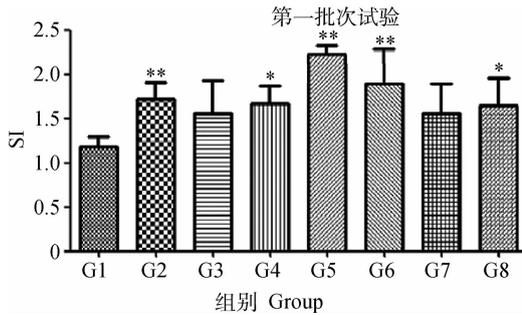
1.4 血清抗体水平测定

从第二次免疫当天开始每周采血,共采 7 次,用

间接 ELISA 法测定血清中猪肺炎支原体特异性 IgG 抗体水平。具体方法如下^[6]:使用猪肺炎支原体全菌蛋白溶液($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为包被抗原,每孔加 $100 \mu\text{L}$, 37°C 孵育 1 h, 4°C 冰箱过夜。次日弃去包被液,用 PBST 洗涤 3 次,加入 3% BSA 封闭液,每孔 $200 \mu\text{L}$, 37°C 封闭 3 h, 然后洗涤 3 次。用 1% BSA 按 1 : 200 比例稀释血清,每孔加 $100 \mu\text{L}$, 37°C 孵育 1 h, 洗涤 3 次。加入 1% BSA 8 000 倍稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 每孔 $100 \mu\text{L}$, 37°C 孵育 30 min, 洗涤 3 次。然后加入底物显色液 TMB : UHP : dH_2O : 磷酸盐缓冲液 (pH5. 2) = 50 : 950 : 10 : 990, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 避光反应 15 min。加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ 每孔 $50 \mu\text{L}$, 使用酶标仪检测, 测定波长 450 nm, 参考波长 630 nm。

1.5 数据处理

淋巴细胞增殖试验数据采用 One-Way ANOVA 方法进行统计分析, 抗体检测数据采用 Repeated-Measures ANOVA 方法进行统计分析, $P < 0.05$ 判定为统计学差异显著, $P < 0.01$ 表示为统计



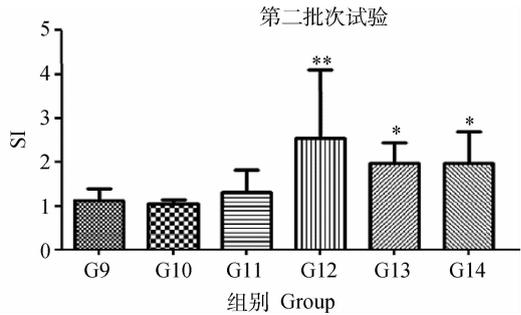
学差异极显著。

2 结果

2.1 小鼠淋巴细胞增殖反应测定

第二次免疫后第 7 天测定小鼠脾淋巴细胞对猪肺炎支原体抗原的增殖应答情况作为细胞免疫应答的评价标准。

由图 1 可见, 第一批次试验各组结果与 G1 阴性对照组相比, G4 组和 G8 组的刺激指数 SI 显著高于对照组 ($P < 0.05$), G2 组、G5 组和 G6 组的刺激指数 SI 极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。由此可见, 在所试各组佐剂中, 卡波姆₉₇₄ + 左旋咪唑混合物佐剂 (G2 组)、卡波姆₉₇₄ + 免疫刺激复合物基质 (ISCOM-matrix) 混合物佐剂 (G5 组)、壳聚糖 + 左旋咪唑混合物佐剂 (G6 组) 对该疫苗细胞免疫刺激能力的增强作用最好; 卡波姆₉₇₄ + 左旋咪唑 + 黄芪多糖混合物佐剂 (G4 组) 和 ISA 11R VG 佐剂 (G8 组) 次之; 卡波姆₉₇₁ + 左旋咪唑混合物佐剂 (G3 组)、GEL 01 ST 佐剂 (G7 组) 无明显作用。



两批次试验结果分别与 G1/G9 阴性对照组比较, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$ 。下图同 Compared with group G1/G9 of negative control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The same as below

图 1 免疫后小鼠淋巴细胞增殖应答情况检测

Fig. 1 Lymphocyte proliferation response in mice after immunization

第二批次试验各组结果与 G9 阴性对照组相比, G13 组和 G14 组佐剂的刺激指数 SI 显著高于对照组 ($P < 0.05$), G12 组的刺激指数 SI 极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。由此可见, 在所试各组佐剂中, β -葡聚糖 + 左旋咪唑 (G12 组) 混合物佐剂对增强该疫苗细胞免疫刺激能力的效果最好, DEAE-Dextran + 左旋咪唑 + 黄芪多糖 (G13 组) 混合物佐剂和 β -葡聚糖 + 左旋咪唑 + 黄芪多糖 (G14 组) 混合物佐剂次之。GEL 01 ST (G10 组) 佐剂、DEAE-Dextran + 左旋咪唑 (G11 组) 混合物佐剂无明显作用。

2.2 小鼠血清 IgG 抗体的 ELISA 测定

对两次免疫后各组小鼠进行定期采血, 测定特异

性血清 IgG 抗体水平作为体液免疫应答的评价标准。

2.2.1 第一批试验检测结果 ELISA 测定见图 2。各佐剂组均产生明显抗体, 卡波姆₉₇₄ + 左旋咪唑 + 黄芪多糖混合物佐剂组 (G4 组) 抗体水平显著高于 G1 阴性对照组 ($P < 0.05$), 其他各组极显著高于 G1 阴性对照组 ($P < 0.01$)。

对各组佐剂进行相互比较, 结果显示, 卡波姆₉₇₄ + ISCOM-matrix 混合物佐剂组 (G5 组) 和壳聚糖 + 左旋咪唑混合物佐剂组 (G6 组) 极显著高于 ($P < 0.01$) GEL 01 ST 佐剂组 (G7 组) 和 ISA 11R VG 佐剂组 (G8 组), 而后两组又极显著高于 ($P < 0.01$) 卡波姆₉₇₄ + 左旋咪唑混合物佐剂组 (G2 组) 和

卡波姆₉₇₁ + 左旋咪唑混合物佐剂组(G3组),后两组又显著高于($P < 0.05$)卡波姆₉₇₄ + 左旋咪唑 + 黄芪多糖混合物佐剂组(G4组)。

由此可见,在所试佐剂浓度下,卡波姆₉₇₄ + ISCOM-matrix 混合物佐剂(G5组)和壳聚糖 + 左旋咪唑混合物佐剂(G6组)在增强体液免疫应答方面的刺激能力是所试各组佐剂中效果最好的;ISA 11R VG(G8组)和 GEL 01 ST(G7组)佐剂次之;其他各佐剂组也能增强体液免疫应答能力,但相较于以上几组作用显得较弱。

2.2.2 第二批试验检测结果 ELISA 测定见图2。各佐剂组均产生明显抗体,DEAE-Dextran + 左旋咪唑混合物佐剂组(G11组)和 β -葡聚糖 + 左旋咪

唑 + 黄芪多糖佐剂组(G14组)抗体水平显著高于阴性对照组($P < 0.05$),其他各组极显著高于对照组($P < 0.01$)。

对各佐剂组进行相互比较,结果显示,GEL 01 ST 佐剂组(G10组)极显著高于其他各组($P < 0.01$),而 DEAE-Dextran + 左旋咪唑(G11组)佐剂组、 β -葡聚糖 + 左旋咪唑混合物佐剂组(G12组)、DEAE-Dextran + 左旋咪唑 + 黄芪多糖佐剂组(G13组)和 β -葡聚糖 + 左旋咪唑 + 黄芪多糖佐剂组(G14组)之间差异不显著($P > 0.05$)。

由此可见,在所试各组佐剂中,GEL 01 ST 佐剂组(G10组)对增强该疫苗体液免疫刺激能力的效果最好,而其他各组佐剂也增强体液免疫应答能力。

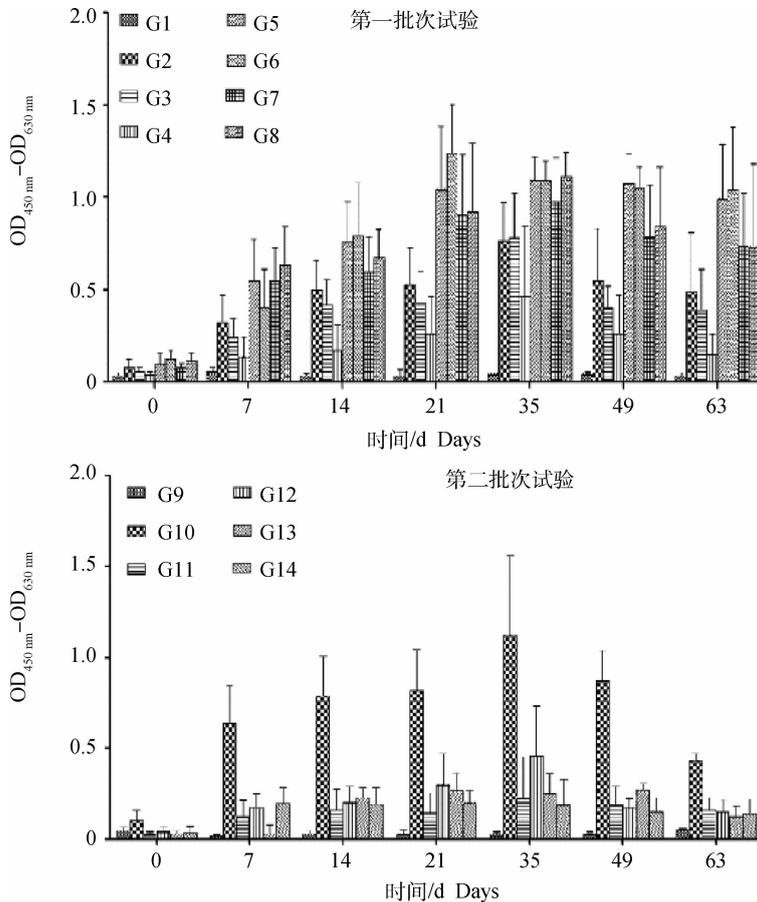


图2 免疫后小鼠血清 IgG 抗体水平检测

Fig. 2 Determination of serum IgG antibody in mice after immunization

3 讨论

根据以往的文献报道,大多数研究者认为在猪支原体肺炎的免疫过程中细胞免疫起重要作用,而体液免疫应答目前被认为与保护力不呈明显相关

性^[7]。因此选择和研制能够有效激活细胞免疫的佐剂是研发猪支原体肺炎灭活疫苗佐剂的关键。同时,考虑到血清抗体是临床检测疫苗免疫效果的最直接手段,优秀的促进体液免疫应答的能力,更有利于疫苗佐剂的市场推广以及临床使用,故而在保证

细胞免疫刺激能力的同时还应尽量兼顾体液免疫的刺激能力^[8]。

两批次小鼠试验结果显示,卡波姆₉₇₄ + 免疫刺激复合物基质 (ISCOM-matrix) 混合物佐剂和壳聚糖 + 左旋咪唑混合物佐剂能够有效地刺激机体细胞免疫和体液免疫应答;卡波姆₉₇₄ + 左旋咪唑混合物佐剂、卡波姆₉₇₄ + 左旋咪唑 + 黄芪多糖混合物佐剂和 ISA 11R VG 佐剂也能一定程度增强机体细胞免疫和体液免疫应答;商品化佐剂 GEL 01 ST 和卡波姆₉₇₁ + 左旋咪唑混合物佐剂对机体体液免疫有明显的的作用,但对机体细胞免疫作用不甚明显;β-葡聚糖 + 左旋咪唑混合物佐剂、DEAE-Dextran + 左旋咪唑 + 黄芪多糖混合物佐剂和 β-葡聚糖 + 左旋咪唑 + 黄芪多糖混合物佐剂能有效促进疫苗的细胞免疫刺激能力,但这几种佐剂对机体的体液免疫刺激作用不强;DEAE-Dextran + 左旋咪唑混合物佐剂对机体体液免疫应答有一定的作用,但对机体的细胞免疫刺激作用不甚明显。

从本试验结果分析,有几种佐剂可诱导机体产生明显的细胞免疫应答,这对于猪支原体肺炎疫苗而言是必要的,而其体液免疫应答作用不甚明显,为解决这一问题,可以向其中添加能有效促进体液免疫应答的其他佐剂成分进一步组成复方佐剂,以保障所形成的佐剂对机体既有明显的细胞免疫应答又有明显的体液免疫应答。

同时,从结果中可看出不同型号卡波姆的作用有所差异。从体液免疫应答角度来看,卡波姆₉₇₄ + 左旋咪唑混合物佐剂组和卡波姆₉₇₁ + 左旋咪唑混合物佐剂组刺激机体产生的抗体水平没有明显的差异,但是,从细胞免疫应答角度来看,卡波姆₉₇₄ + 左旋咪唑混合物佐剂组要优于卡波姆₉₇₁ + 左旋咪唑混合物佐剂组,这可能是由于卡波姆₉₇₄ 和卡波姆₉₇₁ 之间的物理性质差异所造成。此外,通过比较卡波姆₉₇₄ + 左旋咪唑和卡波姆₉₇₄ + 左旋咪唑 + 黄芪多糖混合物佐剂组的结果较为意外地发现,添加黄芪多糖后佐剂的免疫刺激能力有所降低。理论上黄芪多糖具有提高机体免疫力的作用^[9],其添加后佐剂功效反而降低的原因可能与佐剂成分之间的相互兼容性有关。

本研究以小鼠为模型为猪支原体肺炎灭活疫苗筛选水性佐剂及水包油型佐剂,试验结果显示,卡波姆₉₇₄ + 免疫刺激复合物基质 (ISCOM-matrix) 混合

物佐剂与壳聚糖 + 左旋咪唑混合物佐剂能强烈地激活机体细胞免疫及体液免疫,可作为备选佐剂进行后续的本动物试验,为猪支原体肺炎灭活疫苗新型佐剂的研制提供了基础数据。

4 结 论

以小鼠为试验对象评价了几种不同水性及水包油型佐剂配合猪支原体肺炎灭活疫苗免疫动物后对细胞和体液免疫的增强作用,通过分析发现其中卡波姆₉₇₄ + 免疫刺激复合物基质混合物佐剂、壳聚糖 + 左旋咪唑混合物佐剂的效果较好,可同时显著增强细胞及体液免疫应答。

参考文献:

- [1] 李莹莹,何颖,赵武,等.猪支原体肺炎研究进展[J].动物医学进展,2013,34(10):95-100.
- [2] VILLARREAL I, VRANCKX K, CALUS D, et al. Effect of challenge of pigs previously immunised with inactivated vaccines containing homologous and heterologous *Mycoplasma hyopneumoniae* strains [J]. *BMC Vet Res*, 2012, 8:2.
- [3] 熊祺琰,王占伟,甘源,等.免疫刺激复合物基质为佐剂的猪支原体肺炎活疫苗肌肉注射免疫效果评价[J].江苏农业学报,2011,27(6):1310-1315.
- [4] 尹学念.免疫学和免疫学检验实验指导[M].人民卫生出版社,1997:39.
- [5] 赵世云,赵新新,苏华荔,等.猪外周血 T 淋巴细胞增殖反应 MTT 检测方法的建立[J].中国畜牧兽医,2010,37(12):35-38.
- [6] 祝永琴,冯志新,刘茂军,等.猪肺炎支原体 P36 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立[J].江苏农业学报,2010,26(5):987-992.
- [7] MAES D, SEGALES J, MEYNS T, et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs [J]. *Vet Microbiol*, 2008, 126(4):297-309.
- [8] THACKER E L, THACKER B J, BOETTCHER T B, et al. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins [J]. *J Swine Health Prod*, 1998, 6(3):107-112.
- [9] 卢彦琦,贺学礼.黄芪化学成分及药理作用综述[J].保定师范专科学校学报,2004,17(4):40-42.