

刘甜甜, 李欣, 刘增再, 等. 猪肺炎支原体实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (11): 83-88.

LIU T T, LI X, LIU Z Z, et al. Establishment and application of a real-time fluorescence quantitative PCR method for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (11): 83-88.

猪肺炎支原体实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用

刘甜甜¹, 李欣¹, 刘增再², 何瑜², 张建超³, 陈志雄¹, 范杰¹,
王贵平¹, 葛猛^{1*}, 李润成^{1*}

(1. 湖南农业大学动物医学院, 湖南长沙 410128;

2. 长沙市动植物疫病预防控制中心, 湖南长沙 410100;

3. 浏阳市动物疫病预防控制中心, 湖南浏阳 410300)

摘要: 为建立一种高效准确检测猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp) 的实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 方法, 以 Mhp P46 基因为靶基因设计、合成特异性引物及探针, 通过优化反应条件, 建立了 Mhp RT-qPCR 检测方法, 并应用于临床样品检测。结果: 该方法的最佳引物和探针浓度分别为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 最适退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$, C_t 值与标准质粒拷贝数之间具有良好的线性关系, 与其他猪常见病原体无交叉反应, 检测最低拷贝数为 1.0×10^1 copies/ μL , 组内和组间变异系数均小于 2%, 建立的 RT-qPCR 方法特异性、敏感性与重复性均较好; 利用建立的方法与商品化试剂盒对 81 份临床样品进行检测, 显示敏感性优于商品化试剂盒; 同时对湖南省某规模化猪场生长育肥猪进行跟踪监测, 共采集 350 份口、鼻拭子样品, 发现 100~130 日龄属于 Mhp 感染活跃阶段, 且临床用药可减轻感染程度。综上, 本试验建立的 RT-qPCR 方法可用于 Mhp 监测和流行情况调查, 为 Mhp 感染的防控与净化提供技术支持。

关键词: 猪肺炎支原体; 实时荧光定量 PCR; 检测方法

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)11-0083-06

Establishment and application of a real-time fluorescence quantitative PCR method for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*

LIU Tiantian¹, LI Xin¹, LIU Zengzai², HE Yu², ZHANG Jianchao³, CHEN Zhixiong¹, FAN Jie¹,
WANG Guiping¹, GE Meng^{1*}, LI Runcheng^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Changsha Animal and Plant Disease Control Center, Changsha 410100, China;

3. Liuyang Animal Disease Prevention and Control Center, Liuyang 410300, China)

Abstract: To develop an efficient and accurate real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method for detecting *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp), specific primers and probes targeting the P46 gene were designed and synthesized. The method was successfully established and applied to clinical samples by optimizing reaction conditions. The results showed that the optimal primer and probe concentrations were 0.4 and 0.2 $\mu\text{mol/L}$, respectively, with an annealing temperature of 60 $^{\circ}\text{C}$. The method exhibited excellent linearity between the C_t values and standard plasmid concentrations, with no cross-reactivity observed with other common swine pathogens. The detection limit of the method reached 1.0×10^1 copies/ μL , and both the intra- and inter-assay coefficients of variation were below 2%, demonstrating high specificity, sensitivity, and reproducibility. The method was further validated against a commercial kit using 81 clinical samples, where it showed superior sensitivity. Additionally, a monitoring study was conducted on 350 oral and nasal swab samples from growing pigs in a large-scale farm in Hunan Province. And the results indicated that Mhp infection was most active between 100-130 days of age, and clinical medication might reduce severity of infection. In summary, the RT-qPCR method developed here was highly effective for Mhp detection and epidemiological studies, offering strong technical support for infection prevention, control, and eradication.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*; RT-qPCR; detection method

收稿日期: 2024-12-31; 修回日期: 2025-08-26

基金项目: 湖南省重点研发计划项目 (2023NK2017); 湖南省普通高等学校科技创新团队支持计划项目 (2023)

第一作者: 刘甜甜, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 葛猛, 博士, 副教授, 博士生导师, 主要从事动物传染病诊断及防控研究, E-mail: gmg02@126.com; 李润成, 博士, 实验师, 主要从事畜禽传染病防控研究, E-mail: 961095695@qq.com。

猪支原体肺炎是由猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp) 引起的一种慢性呼吸道疾病^[1-2]。Mhp 感染会导致猪的生长速度和饲料转化率降低,一旦猪场传入该病,病原很难在短时间内清除^[3]。Mhp 常与其他病毒或细菌发生混合感染引起猪呼吸道疾病综合征 (porcine respiratory disease complex, PRDC),严重影响猪群出栏率^[4-5]。该病分布十分广泛,世界各地均有发生,被认为是危害各国养猪业的重要疫病之一。因此,加强猪群 Mhp 监测,对指导该病原的预防控制,甚至净化具有非常重大的意义。

猪支原体肺炎有很多诊断方法,如临床诊断(屠宰场监测)、分离培养法、血清学诊断方法、免疫学诊断方法、核酸探针技术和 PCR 诊断技术等^[6]。目前,应用最广泛的 Mhp 抗体检测方法是酶联免疫吸附试验 (ELISA),但市面上常用的 ELISA 试剂盒的灵敏度有限,同时由于生猪感染后抗体产生所需的时间长,将导致监测结果滞后^[7-9]。实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 因其灵敏度高、特异性强、重复性好等优点,能起到尽早发现感染的作用^[10],已成为 Mhp 病原检测的最优方法。Mhp 存在一些免疫原性蛋白,已被评估为用于血清学诊断的有效候选抗原,如细胞溶质蛋白 P36、膜蛋白 P46 和 P65,以及黏附素 P97R1^[11]。P46 蛋白是一种能够将 Mhp 与其他猪源支原体区分开的膜蛋白^[12],基因序列在 Mhp 菌株之间具有很好的保守性。因此,本研究基于 Mhp P46 基因序列,设计引物和探针,建立了 Mhp 的 RT-qPCR 检测方法,并对某猪场不同阶段猪群进行 Mhp 跟踪检测,考察其在生长育肥猪中的感染规律。

1 材料与方法

1.1 阳性核酸样品来源

猪鼻支原体 (*Mycoplasma hyorhinis*, Mhr), 胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP), 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV), 猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus virus type 2, PCV2), 猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV), 伪狂犬病病毒 (pseudorabies virus, PRV) 和猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 等病原阳性核酸均由本实验室制备保存。

1.2 主要试剂和仪器

2×Phamta Max Master Mix 为诺唯赞生物科技有限公司产品;小提质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;DH5α 感受态细胞为北京全式金生物技术有限公司产品;Mhp 核酸检测试剂盒(探针法 qPCR) 购自某生物科技有限公司;2× Accurate Tag HS Probe Premix (UNG Plus)、MagaBio plus 病毒 DNA/RNA 纯化试剂盒 VI (BSC86S1EX) 和全自动核酸提取纯化仪均为杭州博日科技股份有限公司产品;全自动医用 PCR 分析系统 (SLAN-96P) RT-qPCR 仪为上海宏石医疗科技有限公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 引物和探针设计与合成

于 GenBank 下载 MhpP46 基因序列,使用 Prime 5.0 及 Oligo7 软件设计 RT-qPCR 引物 Mhp-F、Mhp-R、探针 Mhp-P 以及制备标准质粒的特异性引物 Mhp-b-F、Mhp-b-R,引物和探针序列见表 1。引物和探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 引物和探针序列

| 引物/探针 | 序列 (5'→3') | 扩增片段长度/bp |
|---------|--------------------------------|-----------|
| Mhp-F | GGTCAAGATTATAATGATAAAGCC | 111 |
| Mhp-R | CCGAAGAACTTCAACAGCAAC | |
| Mhp-P | FAM-YTATCAAAGACGGCGATCAAA-BHQ1 | |
| Mhp-b-F | GGTTCAAAACCAGCTTCTAT | 298 |
| Mhp-b-R | TTGCTAGTTTTGCTTTTAGTTC | |

1.3.2 标准质粒的制备

用核酸提取试剂盒提取 Mhp 阳性样本的 DNA 作为模板,用特异性引物 Mhp-b-F/R 扩增目的片段,然后进行回收纯化、T 载体克隆,转化后挑取阳性单

克隆菌提取质粒,测定浓度后根据公式计算拷贝数。质粒拷贝数 (copies/μL) = 质粒浓度 × 10⁻⁹ × 6.02 × 10²³ / (660 × 质粒总长度)。最后将标准质粒梯度稀释至不同浓度 -20 °C 保存备用。

1.3.3 RT-qPCR 反应体系和条件的优化

RT-qPCR 反应体系为 25 μL ，其中 $2\times$ Accurate Tag HS Probe Premix 12.5 μL ，设置上、下游引物 Mhp-F、Mhp-R 终浓度 0.1 ~ 0.6 $\mu\text{mol/L}$ ，探针 Mhp-P 终浓度 0.05 ~ 0.4 $\mu\text{mol/L}$ ，模板 5 μL ，用 ddH₂O 补至 25 μL 。根据 Ct 值和荧光强度来确定最佳的反应体系。反应程序：37 $^{\circ}\text{C}$ 2 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s；95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，45 个循环。建立最佳反应体系后，以 10 倍梯度稀释的标准质粒作为模板，每个样品重复 3 孔，设置退火温度 56、58、60 $^{\circ}\text{C}$ 进行优化，选择扩增结束后 Ct 值小、Rn 值高且曲线平滑的温度为最适退火温度。

1.3.4 标准曲线的建立

取梯度稀释的标准质粒为模板进行 RT-qPCR 扩增，每个样品重复 3 孔，将拷贝数以 10 为底的对数与检测的 Ct 值为横纵坐标绘制标准曲线，并计算扩增效率和相关系数。

1.4 方法性能评估

1.4.1 特异性和敏感性试验

用本方法对 Mhr、APP、PRV、CSFV、PCV2、PRRSV、PEDV 的核酸样品为模板进行检测，判断该方法特异性。另外取 10 倍倍比稀释的标准质粒为模板进行扩增，同时设定阴性对照，确定 Mhp 最低检测限度。

1.4.2 重复性试验

以 10 倍倍比稀释的标准质粒为模板，每个浓度重复 3 个孔，分别进行组内重复试验和组间重复试验。计算平均值与变异系数，判断该方法的可重复性。

1.4.3 稳定性试验

将不加模板的反应体系于 25 $^{\circ}\text{C}$ （不避光）、25 $^{\circ}\text{C}$ （避光）、4 $^{\circ}\text{C}$ 和 -20 $^{\circ}\text{C}$ 各保存 7 d，将体系于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 和室温冻融 5 次和 10 次。分别对标准质粒进行扩增，以现配体系作为对照组，通过检测结果，判断该方法稳定性。

1.5 与商品化试剂盒对比检测

用本方法与商品化试剂盒同时检测 81 份临床样品，进行一致性检验，对于不相符的样本采用普通 PCR 扩增测序判定结果。

1.6 检测方法的初步应用

于湖南省某规模化猪场选取 50 头 60 日龄的仔猪打上耳牌，按个体大小分成 5 组（A、B、C、D、E 组），分 5 个栏位在同一个区域由同一个饲养员饲养，根据 Mhp 感染规律、猪场的用药以及生产节奏，于不同日龄采集口、鼻拭子样品，用建立的方法进行

Mhp 监测，分析感染规律。

2 结果与分析

2.1 标准质粒的制备

测得制备质粒浓度为 231 ng/ μL ，根据公式计算出 Mhp 质粒的拷贝数为 7.07×10^{11} copies/ μL ，并将质粒依次稀释为 $7.07\times 10^1 \sim 7.07\times 10^{10}$ copies/ μL ，于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2 RT-qPCR 反应体系和条件的优化

选取 $7.07\times 10^1 \sim 7.07\times 10^4$ copies/ μL 10 倍梯度浓度的标准质粒为模板，通过矩阵法，对 RT-qPCR 反应中的引物浓度、探针浓度和退火温度进行优化。结果显示，最佳引物浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ ，探针浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ，最佳退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3 标准曲线的建立

取 $7.07\times 10^2 \sim 7.07\times 10^9$ copies/ μL 10 倍梯度浓度的标准质粒为模板进行 RT-qPCR 扩增，结果显示，拷贝数的对数与 Ct 值之间呈线性相关（图 1），Mhp 的回归方程为 $y = -3.4007x + 47.35$ ($R^2 = 0.9993$, $E = 96.81\%$)。回归方程相关系数 R^2 高于 0.999，扩增效率 E 介于 90% ~ 110% 之间，与之相对应的斜率介于 -3.58 ~ -3.1 之间，说明建立的 RT-qPCR 方法较为理想。

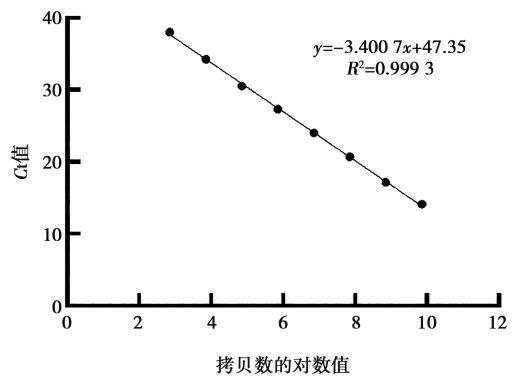
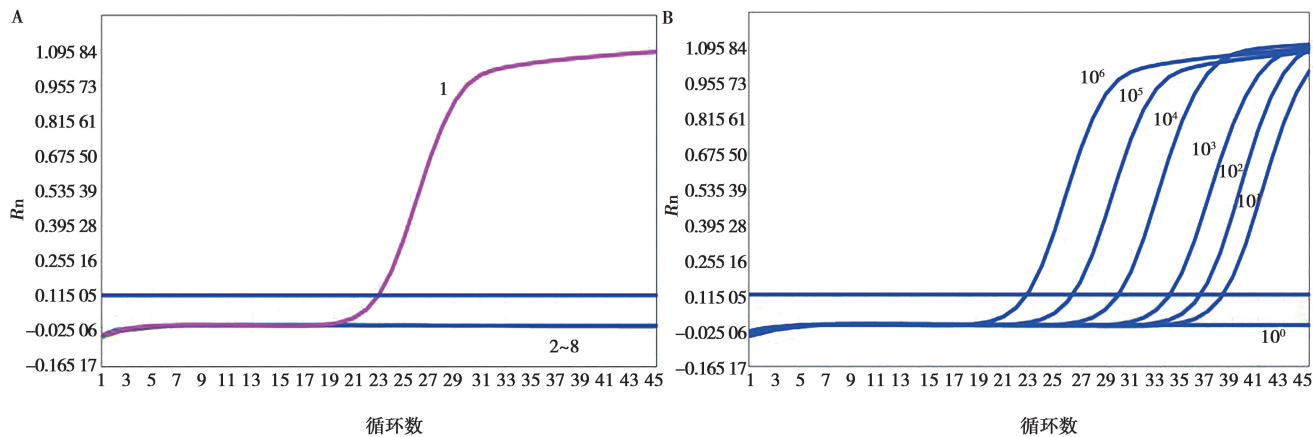


图 1 Mhp RT-qPCR 标准曲线

2.4 方法性能的评估

2.4.1 特异性和敏感性试验

用本研究建立的 RT-qPCR 检测方法对 Mhp、Mhr、APP、PRV、CSFV、PCV2、PRRSV、PEDV 的核酸进行检测，结果显示（图 2A），仅 Mhp 扩增出了特异性曲线和 Ct 值，其他均为阴性，证明本试验建立的检测方法具有良好的特异性。将 7.07×10^7 copies/ μL 浓度的标准质粒以 10 倍倍比稀释（ $1\times 10^0 \sim 1\times 10^6$ ）为模板，采用建立的方法进行扩增，结果表明（图 2B），该检测方法的最低检测限度可达 1.0×10^1 copies/ μL ，说明本研究方法敏感性较高。



1. Mhp 阳性样本；2~8. 分别为 Mhr、APP、PRV、CSFV、PCV2、PRRSV 和 PEDV 阳性样本。

图 2 Mhp RT-qPCR 特异性 (A) 和敏感性曲线 (B) 分析

2.4.2 重复性试验

选取 5 个浓度 ($7.07 \times 10^2 \sim 7.07 \times 10^6$ copies/ μL) 的标准质粒为模板, 利用本试验建立的 RT-qPCR 方法进行组内和组间的重复性试验, 结果显示 (表 2),

组内 Ct 值变异系数在 0.03% ~ 0.57% 之间, 均小于 2%, 组间 Ct 值变异系数为 0.24% ~ 1.52%, 同样均小于 2%, 表明该方法具有良好的重复性。

表 2 Mhp RT-qPCR 重复性试验

| 质粒浓度/ (copies · μL^{-1}) | 组内重复试验 | | | 组间重复试验 | | |
|---|--------|------|--------|--------|------|--------|
| | 平均值 | 标准差 | 变异系数/% | 平均值 | 标准差 | 变异系数/% |
| 7.07×10^6 | 22.83 | 0.03 | 0.12 | 22.81 | 0.06 | 0.24 |
| 7.07×10^5 | 26.39 | 0.01 | 0.03 | 26.35 | 0.10 | 0.38 |
| 7.07×10^4 | 29.97 | 0.17 | 0.57 | 29.93 | 0.14 | 0.46 |
| 7.07×10^3 | 34.01 | 0.07 | 0.21 | 33.67 | 0.38 | 1.13 |
| 7.07×10^2 | 36.31 | 0.16 | 0.43 | 36.56 | 0.56 | 1.52 |

2.4.3 稳定性试验

将优化后的反应体系于不同条件下进行加速稳定性试验, 如表 3 所示, 本方法在不同条件下保存 7 d

及冻融 5 次和 10 次后均有较高的检测水平, 表明该方法稳定性较好。

表 3 Mhp RT-qPCR 稳定性试验结果

| 检测项目 | 现配体系 | 保存组 | | | | 冻融组 | |
|------|-------|--------|-------|-------------|------------|-------|-------|
| | | -20 °C | 4 °C | 25 °C (不避光) | 25 °C (避光) | 5 次 | 10 次 |
| Ct 值 | 30.63 | 30.73 | 30.33 | 30.29 | 30.31 | 30.25 | 30.56 |

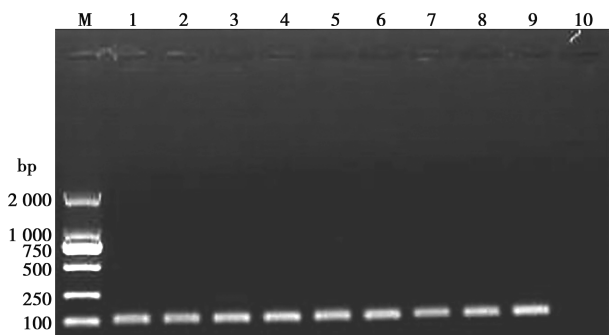
2.5 与商品化试剂盒对比检测

利用建立的 Mhp RT-qPCR 方法与商品化试剂盒同时对采集的 81 份口鼻拭子进行检测。结果显示 (表 4), 本研究建立的方法共检出阳性样品 44 份, 阳性率为 54.32%; 而商品化试剂盒检测出 35 份阳性样品, Mhp 阳性检出率为 43.21%。将结果有差异的 9 份样品的 PCR 产物作为模板, 用荧光定量引物进

行普通 PCR 扩增, 由图 3 可见均扩增出了约 110 bp 的目的片段。将扩增的 9 份 PCR 产物送擎科生物工程技术有限公司进行测序, DNA 序列比对结果显示, 均为 Mhp 的 P46 基因片段。结果说明该 9 份样品确实为 Mhp 阳性, 本研究建立方法的敏感性优于比对的商品化试剂盒。

表4 与商品化试剂盒的对比检测结果

| 检测方法 | 商品化试剂盒 | | | |
|---------|--------|-----|----|----|
| | 阳性数 | 阴性数 | 总计 | |
| RT-qPCR | 阳性数 | 35 | 9 | 44 |
| | 阴性数 | 0 | 37 | 37 |
| | 总计 | 35 | 46 | 81 |



M. DNA 分子质量标准；1~9. 有差异样品；10. 阴性对照。

图3 差异样品的 Mhp PCR 扩增

2.6 检测方法的初步应用

对湖南省某规模猪场生长育肥猪跟踪采集的 60、97、107、127、137、151、160 日龄猪的口鼻拭子进行 Mhp RT-qPCR 检测，并统计不同日龄段各组猪的阳性率，结果见图 4。5 组猪 Mhp 感染规律大体一致。97 日龄口鼻拭子阳性率出现明显上升，107 日龄均出现下降。至 127 日龄各组猪 Mhp 阳性率再度上升，A、B 和 C 组达到感染高峰（阳性率 > 80%），D 组于 137 日龄达到高峰，E 组于 151 日龄达到高峰，随后于 160 日龄，除 A 组阳性率有所上升外，口鼻拭子 Mhp 阳性率整体均出现降低（30%~70%）。

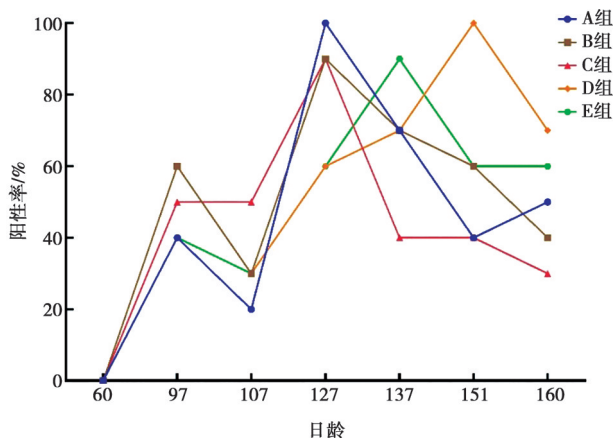


图4 湖南省某规模化猪场生长育肥猪不同日龄 Mhp 病原监测结果

3 讨论

猪支原体肺炎临床症状与其他呼吸系统疾病的症状相似，并且常与其他病原混合发生感染。该病原在我国养猪业中较为常见，2016—2019 年，宋志强等^[13] 对全国 26 个省份 375 个猪场，总计 35 995 头上市肥猪样本的检测，发现 Mhp 阳性率为 67%，并通过调查分析结果估算出中国养猪业平均每年因 MPS 造成的损失高达 82.8 亿元。邱刚等^[14] 对林芝地区未经 Mhp 疫苗免疫的藏猪进行调查，发现 Mhp 抗体总阳性率 72.69%，除仔猪阶段外（未能排除是否存在母源抗体），育肥猪的阳性率最高，为 76.38%。李新萃等^[15] 同样调查发现新疆地区 Mhp 感染率较高，913 份肺脏中 Mhp 阳性 730 份，阳性率为 80%（730/913），与 PRRSV、PCV2 或 APP 的混合感染率为 57.1%。广东省南部的一项研究发现，集约化养殖的猪群中 Mhp 感染率平均为 45.7%，其中公猪的感染率最高（68.8%）^[16]。Mhp 感染严重影响猪群生长性能，导致饲料转化率降低^[17]，给养猪业造成巨大的经济损失^[18]。有研究表明成功根除 Mhp，进行药物治疗、母猪免疫驯化和疫苗接种等管理措施是有效的，可得到显著的投资回报^[19]。综上，Mhp 在猪群中感染率高，且常与其他病原混合感染，给养猪场带来巨大经济损失。因此，做好精准诊断和综合防控非常重要。

RT-qPCR 技术广泛应用于 Mhp 的检测，检测耗时短，不需要琼脂糖凝胶电泳等步骤即可判定结果，且采集鼻、喉拭子样本即可快速地检测到 Mhp 病原体，比血清样本的 ELISA 抗体检测具有更高的诊断灵敏度^[20-21]。此外，鼻拭子样品对不同生产阶段猪群均具有更好的采集便利性与检测适用性，可进行大批量样品检测，既节约时间，又提高了检测效率^[22]。目前，Mhp RT-qPCR 选取保守基因片段主要是 Mhp P36 基因、183 基因以及 P97 基因^[10,23-25]。Mhp P46 基因是一种高度保守的蛋白编码基因，本试验以该基因为靶标设计引物、探针，并成功建立了一种 Mhp 的 RT-qPCR 检测方法。该方法灵敏度高，最低检出浓度可达 1.0×10^1 copies/ μ L；具有较好的特异性，对 Mhr、APP、PRV、CSFV、PCV2、PRRSV、PEDV 等均无交叉反应；组内和组间重复性试验 Ct 值变异系数均小于 2%，表明具有良好的重复性。与商品化试剂盒进行对比，本方法的阳性检出率更高，对于检测结果有差异的样品经普通 PCR 扩增及测序验证均为 Mhp 阳性，表明该方法敏感性优于参与比对的商品化试剂盒。

本研究还对湖南省某规模化猪场 50 头生长育肥

猪进行跟踪监测发现, 60 日龄均未检测到 Mhp, 一方面可能由于跟踪时间是从 6 月份开始, 此时湖南省气温较高, 栏舍通风状况好, 生猪 Mhp 感染相对较轻; 另一方面由于保育期间用药较多, Mhp 感染传播并不明显。至 97 日龄, 发现感染率上升, 但 107 日龄阳性率又出现明显下降, 这与该猪场在 100 日龄开始进行常规的抗支原体现场加药相关。综合各个阶段监测结果, 发现该猪场生长育肥猪在 100~130 日龄属于 Mhp 感染活跃阶段, 持续到 150 日龄仍存在 Mhp 的感染流行, 为生长育肥猪 Mhp 的防控提供了参考数据。

综上所述, 本研究建立的针对 Mhp 的 RT-qPCR 检测方法不仅灵敏性高, 特异性和重复性也较好, 可以用于临床样品 Mhp 检测和流行病学调查。

参考文献:

- [1] ERLANDSON K, EVANS R, THACKER B, et al. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. J Swine Health Prod, 2005, 13 (4): 198-203.
- [2] 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]. Vet Microbiol, 2009, 134 (3/4): 261-266.
- [3] MAES D, SIBILA M, KUHNERT P, et al. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs; knowledge gaps for improved disease control [J]. Transbound Emerg Dis, 2018, 65 (S1): 110-124.
- [4] ZHOU G, TIAN Y, TIAN J, et al. Oral immunization with attenuated *Salmonella choleraesuis* expressing the P42 and P97 antigens protects mice against *Mycoplasma hyopneumoniae* challenge [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10 (6)
- [5] 陈财, 华利忠, 甘源, 等. 猪支原体肺炎净化研究进展 [J]. 中国动物保健, 2014, 16 (11): 16-19.
- [6] 申开梅, 李颖平, 张映. 猪支原体肺炎诊断及检测技术 [J]. 畜禽业, 2006, 17 (11): 42-44.
- [7] TIAN Y, XU Z, WEN Y, et al. Development of an indirect ELISA for detection of anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* IgG in naturally infected pathogen-induced convalescent sera [J]. BMC Vet Res, 2021, 17 (1): 123.
- [8] NETO J C G, STRAIT E L, RAYMOND M, et al. Antibody responses of swine following infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinitis*, *M. hyosynoviae* and *M. flocculare* [J]. Vet Microbiol, 2014, 174 (1/2): 163-171.
- [9] POETA SILVA A P S, MAGTOTO R L, SOUZA ALMEIDA H M, et al. Performance of commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* serum enzyme-linked immunosorbent assays under experimental and field conditions [J]. J Clin Microbiol, 2020, 58 (12): e00485-20.
- [10] 宋建领, 高华峰, 信爱国, 等. 猪肺炎支原体实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 畜牧与兽医, 2013, 45 (5): 71-74.
- [11] FENG Z X, BAI Y, YAO J T, et al. Use of serological and mucosal immune responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P97R1, P46 and P36 in the diagnosis of infection [J]. Vet J, 2014, 202 (1): 128-133.
- [12] LIU W, JIANG P, SONG T, et al. A recombinant chimera vaccine composed of LTB and *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P97R1, mhp390 and P46 elicits cellular immunologic response in mice [J]. Vaccines, 2023, 11 (8): 1291.
- [13] 宋志强, 高地, 冯辉辉, 等. 2016—2019 年通过屠宰检查对中国猪支原体肺炎的流行病学调查 [J]. 今日养猪业, 2020 (5): 74-76.
- [14] 邱刚, 芮亚培, 刘锁珠, 等. 西藏林芝地区藏猪肺炎支原体感染情况的调查 [J]. 动物医学进展, 2018, 39 (2): 131-134.
- [15] 李新苹, 卞赛赛, 曹剑, 等. 新疆规模化屠宰场猪肺炎支原体感染的检测分析 [J]. 畜牧与兽医, 2020, 52 (9): 121-125.
- [16] HE Y, XU M J, ZHOU D H, et al. Seroprevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs in subtropical Southern China [J]. Trop Anim Health Prod, 2011, 43 (3): 695-698.
- [17] SIBILA M, PIETERS M, MOLITOR T, et al. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection [J]. Vet J, 2009, 181 (3): 221-231.
- [18] 王晨, 孟玉凯, 高宇, 等. 山西省猪呼吸道疾病综合征病原感染状况调查 [J]. 山西农业科学, 2021, 49 (4): 509-513.
- [19] SILVA G S, YESKE P, MORRISON R B, et al. Benefit-cost analysis to estimate the payback time and the economic value of two *Mycoplasma hyopneumoniae* elimination methods in breeding herds [J]. Prev Vet Med, 2019, 168: 95-102.
- [20] CLAVIJO M J, HU D, KRANTZ S, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* surveillance in pig populations: establishing sampling guidelines for detection in growing pigs [J]. J Clin Microbiol, 2021, 59 (5): e03051-20.
- [21] GARCIA-MORANTE B, MAES D, SIBILA M, et al. Improving *Mycoplasma hyopneumoniae* diagnostic capabilities by harnessing the infection dynamics [J]. Vet J, 2022, 288: 105877.
- [22] 甘源, 苏丽娟, 韦艳娜, 等. 不同种类呼吸道样品活体检测猪肺炎支原体抗原和抗体的比较分析 [J]. 畜牧与兽医, 2023, 55 (9): 100-105.
- [23] 周颖, 赵硕, 覃国喜, 等. 猪肺炎支原体和猪鼻支原体 TaqMan 双重荧光 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 动物医学进展, 2024, 45 (2): 11-16.
- [24] 闫微, 杨柳, 龙云志, 等. 猪肺炎支原体 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 中国动物检疫, 2024, 41 (2): 72-79.
- [25] 刘莹, 李峰, 殷宗俊, 等. 猪肺炎支原体实时荧光定量 PCR 检测方法建立及应用 [J]. 动物医学进展, 2024, 45 (6): 34-38.