

王娟, 庄于涵, 朱利塞, 等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白、猪链球菌 2 型、副猪格蓝菌 (4 型+5 型) 三联灭活疫苗抗原配比研究 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (5): 117-122.

WANG J, ZHUANG Y H, ZHU L S, et al. Research on the antigen ratio of trivalent inactivated vaccine using porcine circovirus type 2 Cap protein, *Streptococcus suis* serotype 2 and *Glaesserella parasuis* (serotype 4 and serotype 5) [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (5): 117-122.

## 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白、猪链球菌 2 型、副猪格蓝菌 (4 型+5 型) 三联灭活疫苗抗原配比研究

王娟<sup>1,2,3</sup>, 庄于涵<sup>1,2,3</sup>, 朱利塞<sup>1,2,3</sup>, 东笑<sup>1,2,3</sup>, 钟永亮<sup>1,2,3</sup>, 王贵平<sup>1,2,3</sup>, 伍建敏<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 广东海锐生物技术有限公司, 广东 广州 511400;

2. 广东省养猪与猪病防控技术研究企业重点实验室, 广东 广州 511400;

3. 广东海大集团股份有限公司, 广东 广州 511445)

**摘要:** 为研究用于预防猪呼吸道疾病综合征 (PRDC) 部分病原体的多联多价灭活疫苗抗原最佳配比, 以大肠杆菌表达的猪圆环病毒 2 型 (PCV2) Cap 蛋白 (2d 基因型)、猪链球菌 2 型 (SS2)、副猪格蓝菌 (GPS) 4 型和 5 型菌株灭活菌体作为抗原, 先验证各抗原制成单苗的最小免疫剂量, 然后将最小免疫剂量及其 2 倍剂量组合成 6 种不同配比的联苗免疫猪只进行效力评估。结果: PCV2 Cap 蛋白、SS2 S2133 株、GPS 4 型 (H4-131 株) 和 5 型 (H5-58 株) 的最小免疫剂量分别为 50  $\mu\text{g}$ 、 $1 \times 10^9$  CFU、 $2.0 \times 10^9$  CFU 和  $2.0 \times 10^9$  CFU; 联苗免疫效果评估显示, 各抗原之间无显著拮抗作用或协同作用; 二免后 28 d, 以最小免疫剂量组制备的疫苗, 可使免疫组中多数猪只 (4/5) PCV2 中和抗体效价  $\geq 1:32$ , SS2 免疫攻毒 4/5 保护, GPS 4 型和 5 型微量凝集抗体效价均表现为多数猪只 (4/5)  $\geq 1:16$ ; 经单因素方差分析, 确定最佳疫苗配比为各抗原最小免疫剂量的 2 倍, 该配比下猪只 (5/5) 二免后 PCV2 中和抗体效价提升至  $\geq 1:64$ , GPS 4 型和 5 型微量凝集抗体效价所有猪只 (5/5) 均提升至  $\geq 1:32$ , 与最小免疫量配比组相比抗体水平差异分别为显著 ( $P < 0.05$ ) 和极显著 ( $P < 0.01$ ), SS2 仍 4/5 保护。同时确认疫苗最佳乳化工艺为 60~120 r/min 搅拌 30 min。综上, 本研究为猪呼吸道多联疫苗的研发提供了关键数据支持。

**关键词:** PCV2; SS2; GPS4 型; GPS5 型; 抗原配比; 三联灭活疫苗

**中图分类号:** S852.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2026)05-0117-06

## Research on the antigen ratio of trivalent inactivated vaccine using porcine circovirus type 2 Cap protein, *Streptococcus suis* serotype 2 and *Glaesserella parasuis* (serotype 4 and serotype 5)

WANG Juan<sup>1,2,3</sup>, ZHUANG Yuhan<sup>1,2,3</sup>, ZHU Lisai<sup>1,2,3</sup>, DONG Xiao<sup>1,2,3</sup>, ZHONG Yongliang<sup>1,2,3</sup>,

WANG Guiping<sup>1,2,3</sup>, WU Jianmin<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Guangdong Hairui Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou 511400, China;

2. Guangdong Province Key Laboratory of Research on the Technology of Pig-breeding and Pig-disease prevention, Guangzhou 511400, China;

3. Guangdong Haid Group Co., Ltd., Guangzhou 511445, China)

**Abstract:** The aim of this study was to optimize the antigen ratio and emulsification process for the trivalent inactivated vaccine against major pathogens associated with porcine respiratory disease complex (PRDC). The Cap protein (genotype PCV2d) expressed by *Escherichia coli* expression system, inactivated *Streptococcus suis* serotype 2 (SS2) strain S2133, inactivated *Glaesserella parasuis* (GPS) serotype 4 strain H4-131 and serotype 5 strain H5-58 were used as antigens. Then, the minimum immunization dose for each antigen was first determined. Subsequently, six trivalent vaccine formulations with varying antigen ratios (combining the minimum immunization dose and its double dose) were prepared and used to immunize piglets. The results were that the minimum immunization doses for PCV2 Cap protein, SS2, GPS serotype 4, and GPS serotype 5 were 50  $\mu\text{g}$ ,  $1.0 \times 10^9$  CFU,  $2.0 \times 10^9$  CFU, and  $2.0 \times 10^9$  CFU, respectively; and that no significant antagonistic or synergistic effects were observed among the antigens. The trivalent vaccine formulated at the minimum immunization dose induced

收稿日期: 2025-05-15; 修回日期: 2026-03-17

第一作者: 王娟, 女, 硕士, 高级兽医师

\* 通信作者: 伍建敏, 助理研究员, 主要从事预防兽医微生物与免疫学研究, E-mail: wujm01@haid.com.cn.

PCV2 neutralizing antibody titers  $\geq 1:32$  in 4/5 pigs, provided 4/5 protection against SS2 challenge, and elicited GPS serotype 4 and 5 micro-agglutination antibody titers  $\geq 1:16$  in 4/5 pigs at 28 days post-booster. The one-way ANOVA analysis determined the optimal antigen ratio to be twice the minimum immunization dose for each component. This optimized formulation elevated PCV2 neutralizing antibody titers to  $\geq 1:64$  in 5/5 pigs and GPS serotype 4 and serotype 5 micro-agglutination antibody titers to  $\geq 1:32$  in 5/5 pigs, compared with the group receiving the minimum immunization dose, the differences in antibody levels were significant ( $P < 0.05$ ) and extremely significant ( $P < 0.01$ ), respectively, but still maintained a 4/5 protection rate against SS2. The optimal emulsification process was determined to be stirring at 60~120 r/min for 30 minutes. The present study on trivalent inactivated vaccine provided key data support for the development of combination vaccines against PRDC.

**Keywords:** PCV2; SS2; GPS serotype 4; antigen ratio; trivalent inactivated vaccine

猪呼吸道疾病综合征 (PRDC) 是由多种病原体、养殖环境及管理水平等多因素相互作用而导致的一类疾病的总称<sup>[1]</sup>, 目前公认引起 PRDC 的病原体主要有猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪圆环病毒 2 型 (PCV2)、伪狂犬病病毒 (PRV)、猪链球菌 (SS)、副猪格拉菌 (GPS)、胸膜肺炎放线杆菌 (APP) 等。PRDC 主要导致猪只呼吸系统功能障碍, 在临床上表现为体温升高、咳嗽、喘气、呼吸困难、食欲不振、渐进性消瘦, 导致猪只生长缓慢、饲料转化率降低、死淘率上升等问题, 主要危害断奶后保育猪及早期生长育肥猪, 发病率和死亡率分别为 30%~70% 和 4%~6%<sup>[2-3]</sup>, 是影响全球猪业发展的重要疾病。

由于 PRDC 是由多种因素引起的综合性疾病, 目前疫苗接种仍是最为经济有效的防控方法。市售预防呼吸道病原的疫苗中, PRRSV 以弱毒疫苗为主, 其他几种呼吸道病原的联苗中, 有 PCV2 与 GPS 苗、GPS 与 SS 及 PCV2 与猪肺炎支原体的联苗, 无 3 种病原及以上联苗。综合引起 PRDC 主要病原的流行和致病特点, 以及现有疫苗获批情况和临床需求, 本研究选取 PCV2、SS 及 GPS 病原进行多联多价灭活疫苗的抗原配比研究, 其中 PCV2 选取国内优势流行基因型 PCV2d, 采用重组大肠杆菌表达 Cap 蛋白全长, 纯化后自组装高浓度病毒样颗粒 (VLPs)<sup>[4]</sup>; SS 和 GPS 抗原均选取国内目前流行血清型 (SS2、GPS 4 型和 5 型), 经高密度发酵培养灭活后制备而成。在前期完成各抗原致病性、免疫原性研究及佐剂筛选的基础上 (数据未展示), 进行多重抗原配比研究, 综合免疫攻毒或抗体水平结果最终确定联苗中各抗原最佳配比, 为后续呼吸道多联疫苗研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 抗原

上清液分泌表达 PCV2 (2d) Cap 蛋白的重组大肠杆菌 E2107 株, 及其纯化后的自组装 VLPs、SS2 S2133 株、GPS 4 型 H4-131 株和 5 型 H5-58 株均由

本实验室制备培养及灭活。

### 1.2 佐剂及使用比例

在前期研究基础上, 选择法国赛比克公司 MONTANDE™ GEL 02 PR 复合水佐剂作为多联疫苗的候选佐剂, 经试验测试, 佐剂和抗原的最佳比例为 1:9。

### 1.3 试验动物

PCV2、SS2、GPS 4 型和 5 型抗原、抗体检测结果均为阴性的 2~3 周龄健康易感猪购自于广东省江门鹤山市鹤城镇城西五友猪场。

### 1.4 单苗最小免疫剂量

#### 1.4.1 疫苗配制

将各抗原分别制备成 4 种不同浓度单苗, PCV2 亚单位疫苗中 Cap 蛋白含量分别为 12.5、25、50、72.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; SS2 灭活疫苗中 S2107 株含量分别为  $2.5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1.0 \times 10^9$ 、 $1.5 \times 10^9$  CFU/mL; GPS 4 型疫苗中 H4-131 株含量及 GPS 5 型疫苗中 H5-58 株含量均分别为  $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^9$  CFU/mL。

#### 1.4.2 分组及免疫程序

4 种单苗各选取 2~3 周龄健康易感猪 25 头 (免疫疫苗对应的抗原抗体均为阴性), 随机分为 5 组, 每组 5 头, 4 组为免疫组, 分别免疫 4 种不同浓度单苗, 1 组为空白对照组。

颈部肌肉接种, 免疫剂量均为 2 mL/头, 空白对照组接种等量生理盐水。参考已获批新兽药质量标准, PCV2、SS2 组均免疫 1 次, GPS (4 型和 5 型) 组间隔 21 d 加强免疫 1 次。

#### 1.4.3 免疫效果评估

PCV2 免疫后 28 d 后所有组别猪只前腔静脉采血, 用间接免疫荧光法 (IFA) 测定血清 PCV2 中和抗体效价; SS2 免疫后 28 d 所有组别猪只分别耳缘静脉注射活菌数为  $5 \times 10^7$  CFU/mL 菌液 1 mL, 连续观察 14 d 记录各组发病及死亡情况; GPS (4 型+5 型) 二免后 28 d 所有组别猪只前腔静脉采血, 用微量凝集方法分别测定血清中 GPS (4 型+5 型) 抗体水平。

## 1.5 疫苗最佳抗原配比

### 1.5.1 疫苗抗原配比分组及免疫

以1.4中各抗原组分最小免疫剂量的双倍配制推荐免疫剂量组(A组),然后依次设置1种抗原为最小免疫剂量,其余3种抗原为2倍最小免疫剂量浓度的疫苗(B~E组),4种抗原以最小免疫剂量组合为F组。各组抗原按体积比1:1:1:1制成混合抗原,

然后与MONTANDE™ GEL 02 PR复合水佐剂混合乳化配制成疫苗。选取50头2~3周龄健康易感猪按表1各组数量进行分配,免疫组A~F组(表1)颈部肌肉注射2 mL/头,间隔21 d后以相同免疫方式加强免疫1次;对照组猪只在相同时间点颈部肌肉注射等量生理盐水。

表1 各组疫苗抗原终浓度及猪只免疫数量

组别	动物数量/只	抗原及含量			
		PCV2-Cap/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	SS2/ ( $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	GPS 4型/ ( $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	GPS 5型/ ( $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
A	10	50	$1.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
B	5	25	$1.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
C	5	50	$0.5 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
D	5	50	$1.0 \times 10^9$	$1.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
E	5	50	$1.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$	$1.0 \times 10^9$
F	10	25	$0.5 \times 10^9$	$1.0 \times 10^9$	$1.0 \times 10^9$
对照	10	—	—	—	—

注:对照组注射等量生理盐水。

### 1.5.2 免疫效果评估

二免后28 d,参照1.4.3中方法分别进行PCV2、SS2、GPS 4型及5型部分免疫效果评估,其中SS2的A、C、F、对照组分别选取5头猪只进行攻毒试验。

### 1.6 疫苗乳化工艺

选取1.5.3中最佳抗原配比,乳化机的搅拌转速设定为60、80、120 r/min,乳化时间设定为10、30、60 min,分别测定不同乳化条件下疫苗的外观、剂型、稳定性、黏度(按照2020版《中国兽药典》三部附录进行测定),确定疫苗最佳乳化工艺。

### 1.7 数据统计与分析

采用Graphpad Prism 10软件绘图,并使用软件Analyze功能进行单因素方差(ANOVA)分析。数据以“平均值+标准差”表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 单苗最小免疫剂量

当PCV2 Cap蛋白免疫剂量分别为25、50、100及150  $\mu\text{g}$ 时,免疫后28 d PCV2中和抗体效价分别为3/5、4/5、5/5、5/5猪只 $\geq 1:32$ (图1A)。因此,PCV2 Cap蛋白的最小免疫剂量为50  $\mu\text{g}$ 。当SS2免疫剂量分别为 $0.5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 及 $3 \times 10^9$  CFU时,免疫后28 d攻毒保护率分别为2/5、4/5、5/5、5/5(图1B);因此,SS2 S2133株的最小免疫剂量为 $1 \times 10^9$  CFU。当GPS 4型及5型免疫剂量分别为 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $4 \times 10^9$ 及 $6 \times 10^9$  CFU时,二免

后21 d微量凝集血清抗体效价测定4型(H4-131株)及5型(H5-58株)血清微量凝集效价均表现为1/5、4/5、5/5、5/5猪只 $\geq 1:16$ (图1C、图1D)。因此,GPS 4型(H4-131株)和5型(H5-58株)的最小免疫剂量均为 $2.0 \times 10^9$  CFU。

### 2.2 疫苗最佳配比

#### 2.2.1 不同疫苗配比免疫效果评估

PCV2中和抗体检测结果显示,二免后28 d,50  $\mu\text{g}$ 免疫组(B组、F组)及100  $\mu\text{g}$ 免疫组(A、C~E组)5/5猪只血清PCV2中和抗体效价 $\geq 1:32$ (图2A)。SS2二免后28 d攻毒结果显示,A组、F组4/5保护,C组3/5保护(图2B)。GPS二免后28 d微量凝集血清抗体效价测定结果显示,4型(H4-131株) $2 \times 10^9$  CFU免疫组(D组、F组)效价4/5、3/5猪只 $\geq 1:16$ , $4 \times 10^9$  CFU免疫组(A~C、E组)效价均5/5猪只 $\geq 1:16$ (图2C);5型(H5-58株) $2 \times 10^9$  CFU免疫组(E组)效价4/5猪只 $\geq 1:16$ , $4 \times 10^9$  CFU免疫组(A~D组)效价均5/5猪只 $\geq 1:16$ (图2D)。

#### 2.2.2 最佳抗原配比选择

对不同浓度配比疫苗的免疫结果进行单因素方差分析(ANOVA),A组PCV2中和抗体水平5/5猪只 $\geq 1:64$ ,B组PCV2中和抗体水平4/5猪只 $\geq 1:32$ ,C组SS2免疫攻毒保护率为3/5,D组、F组GPS 4型(均为最小免疫剂量)抗体水平与A组差异均显著( $P < 0.05$ )(图2C、图2D)。E组、F组

GPS 5 型（均为最小免疫剂量）抗体水平与 A 组差异均极显著 ( $P < 0.01$ )（图 2C、图 2D）。以上结果说明，2 倍最小免疫剂量下的 PCV2、GPS4 型及 5 型的免疫效果均优于最小免疫剂量组。将 A 组各抗原免疫结果与同剂量下单苗免疫结果进行比较，PCV2

中和抗体、GPS 4 型、GPS 5 型抗体均无明显差异（图 3），SS2 免疫攻毒保护率均为 4/5，即同等剂量下单苗免疫效果与 4 种抗原混合制备成联苗的免疫效果无明显差异，说明抗原之间无明显互相影响作用。因此，最终选择 A 组为最佳抗原配比剂量组。

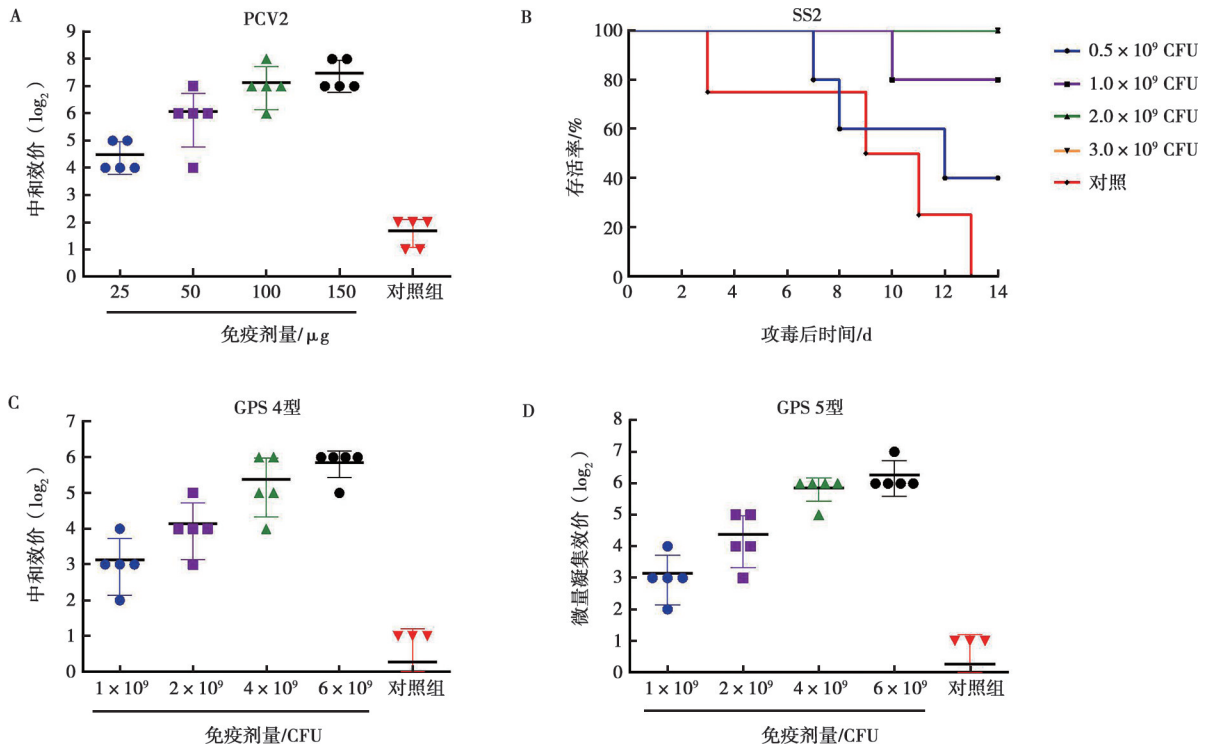
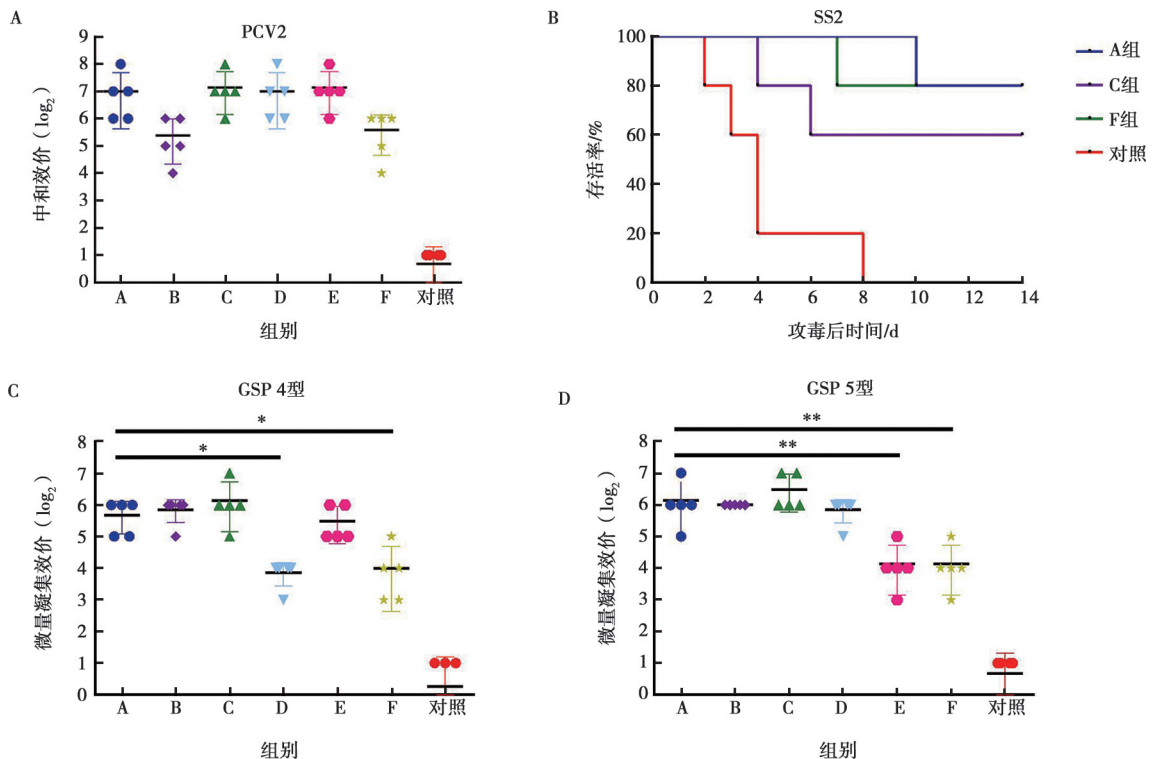


图 1 单苗最小免疫剂量结果



\* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ 。

图 2 疫苗抗原浓度配比结果

### 2.3 疫苗乳化工艺

从疫苗剂型、稳定性、黏度结果显示,以不同搅拌速度及乳化时间制备的疫苗剂型均为水剂;静置后下层有少量沉淀,但振摇后均呈均匀混悬液;黏度测定结果均不超过5 Cp,均符合兽药典标准。外观观察结果显示,当以60 r/min 乳化10 min时,疫苗为不均匀混悬液,不符合要求,而以60 r/min 乳化30、60 min 及以80和120 r/min 乳化10 min 及以上制备的疫苗均为淡黄色水溶性混悬液,久置后底部有少量沉淀,振荡后呈均匀混悬液,符合要求。因此,最终确定乳化工艺为60~120 r/min 搅拌30 min,为方便疫苗配制及计算,将4种抗原用无菌PBS缓冲溶液调整至所需浓度,PCV2 Cap蛋白浓度125 μg/mL,SS2  $1 \times 10^{10}$  CFU/mL, GPS 4型和5型灭活菌液浓度均调整至  $1.0 \times 10^{10}$  CFU/mL,按体积比4:1:2:2的比例制成混合抗原后再与佐剂配比进行乳化。

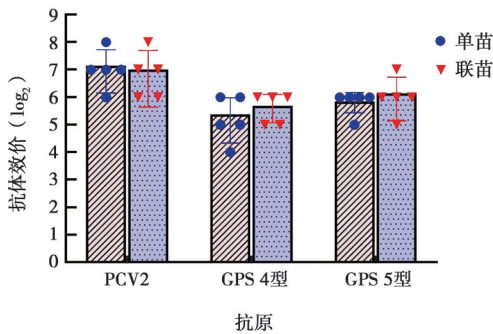


图3 2倍最小免疫剂量单苗与联苗抗体水平对比

### 3 讨论

随着规模化养殖的发展和市场行情的变动加剧,国内生猪养殖过程对生物安全、养殖成活率,损耗率的要求日渐提高,而呼吸道相关的病原种类繁多且均对保育猪易感,是影响其存活率、生产性能的重要因素,因此近年来国内学者对呼吸道病原引起的临床危害关注度越来越高。刘翠权等<sup>[5]</sup>对广西2007—2009年采样检测显示,PCV2是引起PRDC的主要病原之一,感染率为34.52%,细菌病原体中SS感染率最高为8.19%,其次为GPS 3.91%;杨润焕等<sup>[6]</sup>对云南猪场2016—2017年规模化猪场的PRDC调查结果显示病原检测阳性率为88.42%,其中PCV2总阳性率最高(59%),GPS总阳性率达28.07%;Zhu等<sup>[7]</sup>对华东地区调查结果显示PCV2、SS、GPS单个检出率占据前三分别为59.9%、52.3%、33.2%,混合感染样品PCV2+SS、SS+GPS及PCV2+GPS总检出率最高分别为35.4%、33.2%、21.6%;Sun等<sup>[8]</sup>对2017—2021年流行病学调查结果显示PCV2为检出率第二

的病毒病原体22.97%,SS和GPS为细菌病原体检出率最高的分别为63.26%和29.24%。上述研究结果均表明,呼吸道多个病原体混合感染情况显著多于单个病原体感染,目前临床上主要使用的单一疫苗发挥的效果有限;对于细菌病疫苗免疫的轻视、首选抗生素进行防控而导致多重耐药菌株的出现使猪场细菌病原的阳性率逐年上升且居高不下。因此,多联多价疫苗作为防控疫病有力的工具之一,也是未来疫苗的发展方向之一,有必要加强针对呼吸道相关疾病多联多价疫苗的研发。

抗原配比是多联多价疫苗的研发过程中十分重要的环节,抗原之间的兼容性和配比是影响疫苗发挥多重保护作用的关键,需要考虑到抗原量及不同抗原之间的互相影响;抗原量的高低与免疫效果具有最直接的关联,在一定范围内,抗原量与免疫效果呈正相关,但超出这个范围,过高的免疫剂量可能会产生免疫耐受而达到相反的效果。赵香汝等<sup>[9]</sup>在新城疫疫苗的研究中发现5~6倍高剂量免疫后诱导的抗体水平明显低于3倍剂量。本研究在各抗原单苗不同免疫剂量试验中,试验范围浓度(0.5、1.0及2倍最小免疫剂量)内,抗体水平、整齐度(PCV2、GPS)或免疫攻毒保护率(SS2)均随着免疫剂量增加而升高。进行多抗原配比组合时,4种抗原分别设置2倍最小免疫剂量及最小免疫剂量分别组合,与最小免疫剂量直接组合的组别进行免疫效果比较,综合分析结果可知,以4种抗原最小免疫剂量的2倍进行组合免疫效果最佳;等剂量抗原单苗免疫效果与联苗免疫效果经分析均无明显差异,说明PCV2 Cap蛋白、SS2、GPS 4型及GPS 5型4种抗原之间无明显的拮抗作用,也无明显的促进作用。然而,研究发现GPS在4型或5型抗原浓度固定情况下,提高任一抗原浓度,另一抗原对应抗体水平整齐度略有上升,如B组和E组GPS 4型抗体水平及C组和D组GPS 5型抗体水平。这可能是由于GPS是基于荚膜多糖基因簇进行1~15血清学分型,虽然不同血清型荚膜基因簇上的基因在核苷酸水平的相似性在51%及以下<sup>[10]</sup>,但荚膜在GPS与宿主的相互作用中扮演了重要角色,4型和5型抗原可能在各自诱导抗体时产生了一定的协同作用。后续可加大试验规模对这一现象进行深入研究,为细菌的多联多价疫苗研发提供参考。

通过本抗原配比试验,考虑临床猪只个体差异及养殖场生物安全管理水平,为了达到更好的免疫效果,推荐2倍最小免疫剂量为最佳免疫剂量:每头份(2 mL)疫苗中含纯化的PCV2 Cap蛋白100 μg,SS2 S2133株  $2.0 \times 10^9$  CFU, GPS 4型 H4-131株  $4.0 \times 10^9$  CFU, GPS 5型 H5-58株  $4.0 \times 10^9$  CFU。本研究

中各抗原所用浓度或数量级与前期各学者研究结果基本一致<sup>[11-12]</sup>，且4种抗原组合的多联疫苗能同时达到对4种病原均有良好的免疫效果，为多联多价疫苗的研发提供科学数据，后期将进一步验证疫苗的安全性、有效性及保存期等指标。

### 参考文献：

- [1] OPRIESSNIG T, GIMÉNEZ - LIROLA L G, HALBUR P G. Polymicrobial respiratory disease in pigs [J]. *Anim Health Res Rev*, 2011, 12 (2): 133-148.
- [2] KIM J, CHUNG H K, CHAE C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex [J]. *Vet J*, 2003, 166 (3): 251-256.
- [3] FABLET C, MAROIS-CRÉHAN C, SIMON G, et al. Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: a cross-sectional study [J]. *Vet Microbiol*, 2012, 157 (1/2): 152-163.
- [4] MA Z, LIU M, LIU Z, et al. Epidemiological investigation of porcine circovirus type 2 and its coinfection rate in Shandong Province in China from 2015 to 2018 [J]. *BMC Vet Res*, 2021, 17 (1): 17.
- [5] 刘翠权, 梁媛, 陈义祥, 等. 广西规模猪场猪呼吸道疾病综合征的病原学调查 [J]. *畜牧与兽医*, 2010, 42 (10): 29-33.
- [6] 杨润焕, 毕峻龙, 赵谦, 等. 云南省猪场猪呼吸道疾病综合征主要病原调查分析 [J]. *云南农业大学学报 (自然科学)*, 2021, 36 (1): 69-74.
- [7] ZHU H, CHANG X, ZHOU J, et al. Co-infection analysis of bacterial and viral respiratory pathogens from clinically healthy swine in Eastern China [J]. *Vet Med Sci*, 2021, 7 (5): 1815-1819.
- [8] SUN Q, YU X, HE D, et al. Investigation and analysis of etiology associated with porcine respiratory disease complex in China from 2017 to 2021 [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 960033.
- [9] 赵香汝, 徐彤, 靳喜鹏, 等. 接种不同剂量的新城疫疫苗对鸡免疫应答的影响 [J]. *中国兽医杂志*, 2005, 41 (7): 17.
- [10] HOWELL K J, WEINERT L A, LUAN S L, et al. Gene content and diversity of the loci encoding biosynthesis of capsular polysaccharides of the 15 serovar reference strains of *Haemophilus parasuis* [J]. *J Bacteriol*, 2013, 195 (18): 4264-4273.
- [11] 于宁卫, 张力引, 周红, 等. 猪链球菌病与副猪嗜血杆菌病二联四价灭活疫苗的研制 [J]. *中国兽医科学*, 2019, 49 (12): 1542-1548.
- [12] 吕茂杰, 王显兵, 孙晨, 等. 猪圆环病毒2型Cap蛋白、猪肺炎支原体和副猪嗜血杆菌三联灭活疫苗的制备及安全性和有效性评价 [J]. *中国兽医学报*, 2021, 41 (9): 1673-1681.