

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.03.12

兽用生物制品中支原体的 污染来源及检测预防控制措施

张秀华, 路伟, 和彦良, 李淑芬, 胡尚竞, 赵倩雯, 叶双九, 苏玮玮*

(华威特(江苏)生物制药有限公司, 江苏泰州 225300)

[收稿日期] 2019-11-04 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2020)03-0072-06 [中图分类号] S852.62

[摘要] 兽用生物制品是一类特殊的动物保健品, 是控制和消灭动物传染病, 保障动物及人类健康的重要武器之一。若兽用生物制品被支原体污染, 制品的质量和安全性将会受到严重影响, 同时会造成巨大的经济损失。结合生产实际对兽用生物制品支原体污染的主要来源和支原体污染的检测方法进行了介绍, 制定了科学合理的预防控制措施, 以期为确保兽用生物制品无支原体污染, 质量安全可靠提供参考。

[关键词] 兽用生物制品; 支原体; 污染; 检测; 预防

The Pollution Source, Detection, Prevention and Control Measures of *Mycoplasma* in Animal Biological Products

ZHANG Xiu-hua, LU Wei, HE Yan-liang, LI Shu-fen, HU Shang-jing,

ZHAO Qian-wen, YE Shuang-jiu, SU Wei-wei*

(Sinovet(Jiangsu) Biopharmaceuticals Co., Ltd., Taizhou, Jiangsu 225300, China)

Corresponding author: SU Wei-wei, E-mail: suweiwei@sinovetah.com

Abstract: Animal biological products are a kind of special animal health products, which are one of the important weapons to control and eliminate the infectious diseases of livestock and poultry and to protect the health of animals and human beings. If the animal biological products are polluted by *Mycoplasma*, it will have a serious impact on the quality and safety of the products, and will cause huge economic losses. Combined with the production practice, the main sources and the detection methods of *Mycoplasma* pollution in animal biological products are introduced. Scientific and reasonable prevention and control measures are formulated in order to

基金项目: “十三五”国家重点研发计划“动物重大疫病新概念防控产品研发”重点专项“动物重大疫病新型广谱中和抗体疫苗研发”资助项目(2017YFD0501102)

作者简介: 张秀华, 硕士, 兽医师, 从事兽用生物制品质量管理; 路伟, 博士, 兽医师, 从事兽用疫苗的研制与营销, 为共同第一作者。

通讯作者: 苏玮玮。E-mail: suweiwei@sinovetah.com

provide reference for ensuring that animal biological product is free of *Mycoplasma* pollution and its quality is safe and reliable.

Key words: animal biological product; *Mycoplasma*; pollution; detection; prevention

兽用生物制品是用微生物、微生物代谢产物、原虫、动物血液或组织等经加工制成,作为预防、治疗、诊断特定传染病或其他有关疾病的免疫制剂。兽用生物制品的生物安全直接或间接地影响着人类的健康和安全,关注和重视兽用生物制品的质量,既能保障动物健康,更能保障全人类的健康,维护社会稳定。1898年, Nocard 和 Reux 首次从患传染性胸膜肺炎病牛中分离出支原体。牛支原体可感染各年龄段的牛,可导致呼吸系统、生殖系统、角膜炎、乳腺炎及关节炎等疾病^[1]。宿主对牛支原体的清除通常无效,并有可能参与到发病机制中。随着诊断技术的提高,人们对支原体的认识不断深入。目前,自然界中支原体近 100 余种,可直接或间接引起人类或动物的呼吸道感染、生长发育停滞及免疫系统损伤。支原体引起了医学界和兽医界的广泛关注^[2]。

支原体是自然界中存在的最小、最简单的原核生物,大小介于细菌和病毒之间,可通过滤菌器,对许多抗生素有抗性,是细胞培养中一种常见的污染微生物。支原体可通过顶部的细胞器特异性和宿主细胞结合。这些顶部的细胞器含有高浓度的粘附蛋白,可粘附到真核细胞并穿入到细胞内部。支原体缺乏细胞壁,它们的胞膜可和宿主的细胞膜融合,且可交换其胞膜和胞浆成分。支原体污染在生物制品生产过程中依然是棘手的问题,近年来,特别是 2006 年我国全面强制实施兽药 GMP 以来,我国的生物制品行业取得了令人瞩目的成就,行业生产经营环境逐步规范,兽用生物制品的种类、数量不断增加,质量得到不断提升,产销量出现了前所未有的良好势头,为我国动物疫病防控,特别是重大动物疫病防控起到了关键作用^[3]。但随着行业的不断发展,污染的问题依然存在,传统组织活疫苗和细胞毒活疫苗易受支原体污染,一旦污染则损失巨大^[5]。经权威机构检测我国禽用活疫苗支原

体污染率达 70% 以上。刘轶秋等汇总了 2007 - 2011 年间 26 家企业生产的 22 个品种 141 批制品的支原体检验情况,抽检的 141 批生物制品中支原体检验项合格批数为 113 批,不合格 28 批,合格率为 80.1%^[5]。吴华伟等统计了 2008 - 2017 年各类猪用病毒类生物制品不合格批次中,支原体检验不合格占比达 19.8%,并建议应增加支原体的其它检验方法进行补充和完善,方能保证我国兽用生物制品的支原体检验的检出率和准确性^[6]。英聪等在对市场上的兽用疫苗随机抽检中,检测出猪肺炎支原体、鸡毒支原体、滑液支原体和絮状支原体^[7],证明了我国兽用生物制品的支原体污染现象比较普遍。

1 兽用生物制品污染支原体的主要来源

1.1 细胞和种毒污染支原体 种毒在疫苗生产中的作用至关重要,在某种程度上它是疫苗内在质量和属性特点的决定因素,若种毒污染了支原体,通过逐级培养放大,必然会影响疫苗的质量。在细胞培养过程中,支原体污染发生率达 63%,因此,细胞培养过程中支原体污染仍是一个世界性的难题。污染细胞的支原体主要有人源、猪源和牛源三类,还有发酵支原体、猪鼻支原体、口腔支原体、精氨酸支原体、梨支原体、唾液支原体、莱氏无胆甾支原体和人型支原体^[8]。实验室的工作人员是口腔支原体、发酵支原体和人型支原体的主要来源。精氨酸支原体和无胆甾原体主要来自胎牛血清和新生牛血清^[9]。

1.2 血清和胰酶污染支原体 血清作为疫苗生产中的主要原辅材料,极易被支原体污染。支原体是牛血清中常见的微生物之一,不能用除菌过滤膜除去^[10]。现行版《中国兽药典》中生物制品生产和检验用牛血清质量标准中规定必须检验支原体,目的是保证牛血清培养的细胞及其制品无支原体污染。李明生等利用直接培养法、DNA 荧光染色法和

PCR 法对 17 批新生牛血清样品进行了支原体检测,结果表明,应将直接培养法和 DNA 荧光染色法或 PCR 法同时联合应用,以提高血清中支原体检测的准确性。胰酶是疫苗生产过程中细胞传代、消化所需关键物料,取自羊、猪、牛等动物的胰腺,极易污染支原体。

1.3 鸡胚污染支原体 SPF 鸡和鸡胚是禽用生物制品生产和检验环节的主要原材料,直接影响到产品质量和检验结果。国标《GB/T 17999.1-2008 SPF 鸡微生物学监测第一部分:SPF 鸡微生物学监测总则》中关于 SPF 鸡需监测 19 个项目,其中第 4 项和第 5 项要求检测鸡毒支原体和滑液囊支原体^[11]。

1.4 原代细胞或动物组织污染支原体 生产猪瘟活疫苗(细胞源)的细胞为牛睾丸原代细胞或羊睾丸原代细胞,牛或羊动物本身易感染支原体,且被毛较多,消毒不彻底易污染支原体。另外,猪瘟活疫苗(兔源)的生产需使用兔脾脏或淋巴结等组织,同样增加了支原体污染的风险。所以,利用动物组织生产兽用生物制品,污染支原体的风险极高,对接种动物存在较大的威胁。兽用生物制品的生产工艺快速提升,已从原来的原代细胞或动物组织工艺发展到传代细胞系培养,正向悬浮培养工艺发展,大大降低了各种污染的风险,提高了产品质量。

1.5 环境污染支原体 McGarrity 通过一个模型发现了支原体在超净台内的细胞传代过程中的传播速度,活的支原体在超净台表面至少可存活 4~6 d,且可成功复壮。传完被支原体污染的细胞后,再传干净的细胞,在 6 周后仍可检测出支原体阳性,表明支原体的传播容易和快速。

2 常用的支原体检测方法

2.1 一步法试剂盒检测法 目前,多家公司推出 Mycoplasma test kit(one step quick color),一步法试剂盒的原理是环介导等温扩增技术(LAMP),操作简单,加样量仅 1 μ L,通过变色来判定结果。曹元元等将实验室保存的牛支原体(*M. bovis*)分离株复苏培养物用培养法、PCR 检测法和一步法三种方法进行鉴定,结果三种方法都可以鉴定培养物中支原

体的存在;与培养法相比,一步法结果用肉眼就能清晰可见,周期短;与 PCR 检测法相比,一步法操作简单,周期短,但一步法的特异性较差,不能区分不同种属的支原体,因此应采用 PCR 与一步法相结合的方法以提高支原体检测的准确性^[12]。

2.2 PCR 法 PCR 方法具有特异性强、灵敏度高、产率高、可有效缩短检测时间、更加便捷、重复性好、易自动化、对标本的纯度要求低等突出优点。但是,PCR 还有易出现假阳性和假阴性结果、结果不具有肯定性、需多次摸索条件、要求操作熟练等缺点。秦明明等针对 16S rRNA 设计了 5 对引物,经大量试验摸索筛选出了一种可靠快速的实验室支原体 PCR 检测方法,序列为:5' - AGAGTTT-GATCCTGGGCAGGA - 3', 5' - TGCACCATCTGTC-ACTCTGTTAACCTC - 3', 目的片段为 1021 bp,该 PCR 最低能够检出 10 pg 牛支原体基因组 DNA 以及浓度为 100 CCU/mL 的牛支原体培养物^[13]。高广仁等建立了兽用生物制品中支原体污染的 PCR 检测方法,引物序列为:5' - GGGCCAAGAGTTGTA - 3', 5' - CCTTCGCCTATTGGTG - 3', 目的片段约 440 bp,该方法对大肠杆菌、沙门氏杆菌、巴氏杆菌、猪链球菌、猪圆环病毒 2 型、猪伪狂犬病毒、猪瘟病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、新城疫病毒的扩增结果均为阴性;对鸡毒支原体、猪肺炎支原体、禽滑液支原体基因组 DNA 的检测灵敏度分别达到 0.13 ng、0.88 ng、0.14 ng,与培养法的符合率达 98.84%。以上结果表明,PCR 方法适用于兽用生物制品生产的质量控制和疫苗质量检验的补充方法^[14]。

2.3 分离培养法 分离培养法使用固体培养基和液体培养基进行分离培养,大多数支原体可在固体培养基上出现特有的典型菌落,或在液体培养基中出现 pH 值变化,该方法准确、可靠,但培养时间较长,敏感性不够高,易受抗生素影响,且不能检出所有的支原体。目前,在《中国兽药典》中仍以培养法作为支原体的基本检测方法,但兽用生物制品企业亟待增加新的快速检测方法进行补充和完善。卞晓翠等发现 PCR 法和培养法检测支原体具有较好的互补性,应联合使用进行定期检测,以提高支原

体的检出率^[15]。

2.4 DNA 结合荧光素染色 支原体用普通染色法不易着色,用姬姆萨染色很浅,革兰氏染色阴性。DNA 结合荧光素染色法是利用荧光染料(bisbenzimidazole, Hoechst 33258)结合到 DNA 的 A-T 富集区域(A-T 含量达 55%~80%)染色来实现支原体的检测。经染色后被支原体感染的细胞周围出现许多大小均一的荧光小点,证明有支原体存在。DNA 荧光染色法适用于细胞和血清中的支原体检验,检验时间较短,操作简单,能对支原体污染的程度进行定量观察,但对仪器设备要求较高,仅适合于实验室研究^[16]。

2.5 ELISA 法 某公司利用"ELISA 抗体夹心法"的基本原理研制了支原体检测试剂盒,现已上市销售使用。该试剂盒具有结果准确、有效避免假阳性和假阴性、省时省力更经济、方法简单易操作、检测时间仅 4~5 h、价格低廉、高灵敏度、高通量等特点。先将样品 16S ribosomal RNA (rRNA) 标上生物素标签和地高辛标签,再用预先包被在孔板上的链亲和素进行捕获,再加入碱性磷酸酶标记的抗地高辛检测抗体,最后加入底物显色,通过比色法得出结果来判定有无支原体。

3 预防控制支原体的污染

3.1 原材料控制 鸡胚、细胞、胰酶、血清等动物源性原材料均是兽用生物制品的重要生产材料,也是支原体赖以生存的基质,有研究表明有 20 多种支原体易污染鸡胚、细胞或血清,因此,在保证无菌的同时,使用前加强检验可有效阻止支原体污染。另外,在细胞培养方面,良好的个人卫生及操作规范是避免支原体污染的前提,再从制度上建立完善的检验体系,从种细胞或原代细胞到每个代次的细胞都进行严格的检验,保证所有代次的细胞均无支原体污染^[17]。最后,对于新引进的种毒或种细胞必须先隔离培养,经检验合格后方可引进生产车间。

3.2 环境控制 生产车间应定期清洁和消毒,并定期检测,保证环境参数均在可控范围内。生产过程中各个环节的细化,注重人、物、产品以及污物的

进出路径,避免交叉污染。生产设备的消毒要彻底,根据生产用具和器械的特性进行相应的高压灭菌或消毒水浸泡,以确保消毒彻底。进入车间洁净区的所有物品均应经表面消毒或紫外照射后方可进入。

3.3 人员管理 加强对所有人员的生产流程和操作流程的培训,要求所有人员严格按照规定更衣,保证无裸露的皮肤暴露在环境中,对于有呼吸道疾病或皮肤病的人员禁止进入车间洁净区内。同时,要求所有人员的操作必须规范,杜绝任何小的不规范操作细节。例如操作过程中手离开操作台、进入操作台的器械或器皿未进行消毒、用手擦汗或接触到裸露的皮肤等均可能导致支原体污染。

3.4 消毒灭菌环节 通过消毒灭菌可防止各种污染物和微生物的滋生,一方面要对生物制品生产过程中所用到的各种器具和物品进行消毒灭菌,通过无菌测试后方可使用,从源头上控制污染物的出现。另一方面,需注意消毒灭菌方式是否有效。比如高压锅或干热烤箱中堆积过多的物品造成加热不均,导致的未彻底灭菌。或者灭菌循环时间过短,特别是超过 500 mL 的液体,或者包含固体成分的溶液,或胶体物质(如琼脂、淀粉)等。所以,在消毒灭菌前必须考虑灭菌材料的尺寸、质量、性质和体积,方可保证消毒灭菌的效果。

3.5 合理利用抗生素 抗生素对支原体污染具有一定的抑制作用,所以在生物制品生产过程中应合理利用以预防支原体污染现象的发生。但是支原体对一般抗生素不敏感,并具有一定的抗药性,所以应选择有效的抗生素,在控制好使用剂量的前提下,尽量做到既不影响细胞的正常功能,又能较好地控制支原体污染。

4 支原体去除方法

4.1 配套试剂法 目前,有多家公司宣称有配套的去支原体试剂,均具有以下特点:①毒性低:对细胞毒性小,不影响后续细胞实验;②稳定性强:-20℃能较长时间保存,并保持高效用;③操作简单:只需将试剂加至支原体污染的培养基中孵育即可;④起效快:最快 3 d 即可见效;⑤去除范围广:

能去除实验室存在的多种支原体。但配套试剂法的具体效果还需验证。

4.2 抗生素法 张丹丹等运用抗生素(plasmocin)进行了细胞支原体污染控制的研究,成功建立了山羊成纤维细胞培养过程中支原体污染的预防和去除平台^[18]。较常用的抗生素有恩诺沙星、四环素、新霉素、氯霉素、庆大霉素、卡那霉素、巴龙霉素等,如果长时间使用同一抗生素易产生耐药性。若污染了人支原体时,那么加入卡那霉素(1000 mg/mL)完全可以清除。一般对卡那霉素和四环素有抗药性的菌株,对庆大霉素和巴龙霉素抗药性也较大。除了以上抗生素,常推荐使用的还有泰霉素和诺霉素的复合物、喹诺酮的衍生物、Ciprobey(成分为环丙沙星)。多数学者建议联合使用几种抗菌素可以达到去除支原体的效果。

5 结 语

支原体是对人和动物都有致病性的一类重要病原微生物。生物制品一旦被支原体污染,品质会明显下降。由于支原体污染具有隐蔽性,所以加强环境控制和原辅材料的检验控制,是保证制品质量的前提和基础^[19]。

兽用生物制品生产企业应使用快捷有效的支原体检测方法进行早期筛查以避免造成质量事故和不必要的损失。随着 GMP 新版标准的实施,企业应制定更加严格的质量管理制度和质量控制制度、细化每个环节的操作规范、及时把潜在的污染因素排除,兽用生物制品的质量一定会得到很好的保证。

参考文献:

[1] 张文劲, 张文皓, 唐鑫, 等. 牛支原体免疫学及免疫学诊断研究进展[J]. 中国兽医学报, 2019, 9: 1868-1872.
Zhang W J, Zhang W H, Tang X, et al. Research progress in immunology and immunological diagnosis of *Mycoplasma bovis* [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 9: 1868-1872.

[2] 万玉林, 葛玉凤, 武发菊, 等. 兽用疫苗生产中支原体污染检测和预防[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(7): 81-82, 85.
Wan Y L, Ge Y F, Wu F J, et al. Detection and prevention of

Mycoplasma contamination in veterinary vaccine production[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2016, 44(7): 81-82, 85.

- [3] 宋桂才, 赵保华, 赵阳. 我国兽用生物制品行业存在的问题及出路[J]. 兽用市场指南, 2009, 3: 5-6.
Song G C, Zhao B H, Zhao Y, et al. Problems and solutions of animal biological products industry in China[J]. Animal Market Guide, 2009, 3: 5-6.
- [4] 赵金旺. 兽药后 GMP 时代兽用生物制品行业发展趋势与企业经营战略的选择[J]. 中国禽业导刊, 2008, 7: 28-30.
Zhao J W. The development trend of veterinary biological products industry and the choice of business strategy in the era of post GMP veterinary medicine[J]. Guide to Chinese Poultry, 2008, 7: 28-30.
- [5] 刘秩秋, 徐磊, 张瑞婷. 兽用生物制品支原体检验项近 5 年抽检情况分析[J]. 中国兽药杂志, 2012, 47(9): 45-47.
Liu Y Q, Xu L, Zhang R T. Analysis on *Mycoplasma* inoecion of veterinary biological products sampling in recent five years [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2012, 47(9): 45-47.
- [6] 吴华伟, 陈晓春, 秦义娴, 等. 我国猪用病毒类生物制品质量情况分析及建议[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(1): 19-26.
Wu H W, Chen X C, Qin Y X, et al. Analysis and suggestions on quality of swine virus biologics in China[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, 53(1): 19-26.
- [7] 英聪, 刘灿, 宁宜宝, 等. 支原体污染的实验室检测及鉴定方法[C]//第四届中国兽药大会-兽医微生物学-兽医生物制品学学术论坛论文集, 2012: 127-129.
Ying C, Liu C, Ning Y B, et al. The establish of the PCR assay for detection of 14 kinds of *Mycoplasma* contamination in veterinary vaccines[C]//Proceedings of the 4th China Veterinary Medicine Congress - Veterinary Microbiology - Veterinary Biological Products Academic Forum, 2012: 127-129.
- [8] 陈琳, 陈鲤群. 细胞污染及检测鉴定[J]. 中国细胞生物学报, 2017, 39(4): 496-503.
Chen L, Chen L Q. Detection and identification of cell contamination [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2017, 39(4): 496-503.
- [9] 武昱夜, 张旭, 华利忠, 等. 支原体对细胞培养污染的研究概况[J]. 动物医学进展, 2013, 9: 116-121.
Wu Y Z, Zhang X, Hua L Z, et al. Introduction on *Mycoplasma* contamination in cell culture [J]. Progress In Veterinary Medicine, 2013, 9: 116-121.
- [10] 周才学, 田细凤, 龙勇, 等. 聚合酶链反应在牛血清支原体检测中的应用[J]. 微生物学免疫学进展, 2009, 37(2): 36-39.

- Zhou C X, Tian X F, Long Y, *et al.* The application of polymerase chain reaction to the detection of *Mycoplasma* in bovine serus[J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2009, 37(2): 36-39.
- [11] 中国国家标准化管理委员会. SPF 鸡微生物学监测第一部分: SPF 鸡微生物学监测总则: GB/T 17999.1-2008[S]. 北京: 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 2008: 12. China National Standardization Administration. SPF chicken microbiological monitoring part I: General principles of SPF chicken microbiological monitoring: GB/T 17999.1-2008[S]. Beijing: General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, 2008: 12.
- [12] 曹元元, 曹思婷, 郭亚男, 等. 一步法恒温支原体检测试剂盒在牛支原体检测中的应用[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2016, 8: 100-102, 280.
- Cao Y Y, Cao S T, Guo Y N, *et al.* Application of one- step constant temperature *Mycoplasma* detection kit in *Mycoplasma bovis* detection[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2016, 8: 100-102, 280.
- [13] 秦明明, 赵萍, 陈胜利, 等. 检测支原体属特异性的 5 种 PCR 方法的评估和应用[J]. *畜牧与兽医*, 2016, 6: 20-24.
- Qin M M, Zhao P, Chen S L, *et al.* Assessment of five PCR methods for routine detection of *Mycoplasmas* spp [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 6: 20-24.
- [14] 高广仁, 万玉林, 崔治亮, 等. 兽用生物制品中支原体污染 PCR 检测方法的建立与应用[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2018, 15: 163-166.
- Gao G R, Wan Y L, Cui Z L, *et al.* Establishment and application of PCR detection method for *Mycoplasma* contamination in animal biological products[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2018, 15: 163-166.
- [15] 卞晓翠, 王晓婉, 杨振丽, 等. 联合使用聚合酶链式反应和培养法可以提高培养细胞支原体的检出率[J]. *医学研究杂志*, 2018, 6: 28-34.
- Bian X C, Wang X W, Yang Z L, *et al.* The detection rate of *Mycoplasma* in cultured cells can be improved by using PCR and culture[J]. *Journal of Medical Research*, 2018, 6: 28-34.
- [16] 杜永凤, 何信群, 韩咏梅, 等. DNA 荧光染色法和培养法在支原体检测中的比较[C]//2007 年中国畜牧兽医学学会生物制品学分会中国微生物学会兽医微生物学专业委员会学术研讨会论文集, 2007: 607-611.
- Du Y F, He X Q, Han Y M, *et al.* Comparison of DNA fluorescent staining and culture in detection of *Mycoplasma* [C]//2007 Symposium of Veterinary Microbiology Committee of Chinese society of Microbiology, Biological Products Branch of Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2007: 607-611.
- [17] 李小静, 练炳洲, 邓月娥, 等. 生物制品生产中支原体污染的检测和预防[J]. *山东畜牧兽医*, 2012, 1: 59-60.
- LI X J, Lian B Z, Feng Y E, *et al.* Detection and prevention of *Mycoplasma* pollution in the production of biological products[J]. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2012, 1: 59-60.
- [18] 张丹丹, 郑贝贝, 任颜颜, 等. 山羊成纤维细胞培养过程中支原体污染的去及预防平台建立[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2018, 9: 1-5.
- Zhang D D, Zheng B B, Ren Y Y, *et al.* Establishment of platform for prevention and removal of *Mycoplasma* contamination in goat fibroblast *in vitro* culture[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2018, 9: 1-5.
- [19] 余彬辉, 余艳辉, 贾布托. 兽用疫苗生产过程中正确检测和预防支原体污染的方法[J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2018, 34(5): 56.
- Yu B H, Yu Y H, Jia B T. The correct detection and prevention of *Mycoplasma* contamination in the production of veterinary vaccines [J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary Abstracts*, 2018, 34(5): 56.

(编辑:李文平)