

ETEC 菌毛蛋白 K99 抗体 PPA-ELISA 检测方法 的建立及初步应用

谢金文^{1,2}, 白耀国², 李书光^{1,2}, 王金良^{1,2}, 曲光刚^{1,2}, 苗立中^{1,2}, 沈志强^{1,2*}

(1. 山东省滨州畜牧兽医研究院 山东省畜禽用蜂胶疫苗研究开发推广中心, 滨州 256600;

2. 山东绿都生物科技有限公司, 滨州 256600)

摘要: 以纯化的大肠埃希菌 K99 菌毛蛋白为包被抗原, 建立检测大肠埃希氏菌 K99 IgG 抗体的间接 ELISA 方法。确定间接 ELISA 的最适反应条件, 即抗原包被的 ELISA 板 4℃ 过夜, 最适抗原包被浓度为 4.94 μg·mL⁻¹, 兔抗体稀释倍数为 1:50, 猪抗体稀释倍数为 1:200, 确定最佳封闭液为 100 g·L⁻¹ 脱脂奶粉, 最佳封闭时间为 0.5 h, 血清反应时间为 1 h, 二抗最适浓度梯度为 1:2000, 反应时间为 37℃ 0.5 h, 底物室温反应时间为 37℃ 10 min, 阴阳性临界值兔血清为 0.25、猪血清为 0.35。试验证实该间接 PPA-ELISA 方法的特异性强、敏感性高、重复性好, 可以为疫苗效力检验和流行病学调查提供参考方法。

关键词: ETEC; K99; PPA-ELISA; 抗体; 检测; 建立

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)02-0237-06

Development and preliminary application of PPA-ELISA in detection of antibodies against K99 fimbrial protein

XIE Jinwen^{1,2}, BAI Yaoguo², LI Shuguang^{1,2}, WANG Jinliang^{1,2},
QU Guanggang^{1,2}, MIAO Lizhong^{1,2}, SHEN Zhiqiang^{1,2}

(1. Shandong Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Institute, Shandong Research & Development Center of Veterinary Propolis Vaccines, Binzhou, 256600;

2. Shandong Lvdu Biotechnology Co., Ltd., Binzhou, 256600)

Abstract: A PPA-ELISA method for detecting anti-K99 IgG levels was developed by using the porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)-purified K99 fimbrial protein as the coating antigen. The PPA-ELISA was tested with serum samples obtained from rabbits and pigs. The optimal parameters affecting the method were also determined. They were: antigen coated ELISA plates at 4℃ overnight; the optimal coating concentration of K99 was 4.94 μg/mL; the optimal dilution of corresponding serum samples for rabbits was 1:50 and for pigs was 1:200; the optimal blocking solution was 100 g/L skimmed milk powder. The best blocking time, reaction time for serum samples, PPA concentration gradient, PPA reaction time and substrate reaction time at room temperature were 0.5 h, 1 h, 1:2000, 0.5 h, and 10 min, respectively. The positive-negative threshold values of rabbit and pig sera were 0.25 and 0.35, respectively. The results proved that the PPA-ELISA method was sensitive, specific and repeatable and can be applied to the vaccine potency test and epidemiological investigation.

Key words: ETEC; K99; PPA-ELISA; antibody; detection; establishment

产肠毒素性大肠杆菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*, 简称 ETEC) 是引起仔猪腹泻的主要病原之一^[1], 该菌的致病性与其具有黏附素和产肠毒素密切相关。迄今, 在猪源 ETEC 中发现的黏附

收稿日期: 2014-09-04

基金项目: 山东省自然科学基金青年基金项目 (ZR2014CQ009), 滨州市 2013 年科技发展计划项目 (2013GG0304), 山东省现代农业产业技术体系生猪产业创新团队 (SDAIT-06-011-14) 共同资助。

作者简介: 谢金文, 助理研究员。E-mail: 98xiejinwen@163.com

* 通信作者: 沈志强, 研究员。E-mail: bzshenzq@163.com

素抗原 K88 (F4)、K99 (F5)、987P (F6)、F41、F42、F165、F17 和 F18 等, 而以 K88、K99、987P 和 F41 最为流行^[2-3]。以往对 ETEC 的检测多采用间接血凝试验 (IHA), 但是, 间接血凝试验的抗原致敏程序复杂、敏感性不高、重复性差等缺点越来越影响其应用; ELISA 方法具有敏感性好、特异性强、易操作等优点, 已经广泛应用于 ETEC 抗体大规模检测。用菌体作为包被抗原, 虽成本低廉, 但纯度和产量较低, 且特异性差, 易发生交叉反应。粘附素抗原具有良好的免疫原性, 用带有粘附素的菌体或纯化的粘附素抗原免疫动物体均可以产生高效价的相应抗体^[4]。因此, 抗黏附素抗体的检测已成为诊断 ETEC 感染的重要指标。

ETEC 的各种菌毛都是蛋白质, 具有良好的免疫原性, 不耐热, 100℃加热即可破坏其生物学活性和免疫学活性。菌毛抗原是一种具有良好免疫原性的蛋白质, 用菌毛抗原免疫怀孕母猪, 其母源抗体可使仔猪获得对大肠杆菌的被动免疫, 可以有效地防止此类大肠杆菌感染仔猪, 降低仔猪腹泻为养殖业带来的损失。何晓杰^[5]等用纯化的 F41 菌毛蛋白作为包被抗原取得了良好检测效果。PPA-ELISA 方法是检测抗体常用的方法, 其利用酶标记的抗抗体以检测与固相抗原相结合的受检抗体。本试验采用热处理法提取 K99 菌毛抗原, 利用纯化的 K99 菌毛蛋白建立了 ETEC K99 菌毛蛋白 IgG 抗体 PPA-ELISA 检测方法, 以期应用于疫苗的效力检验和流行病学调查。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 脱脂奶粉为美国原装 BD 脱脂奶粉, 酶标板为 JET.BIOFIL 产品, HRP 标记的 SPA 购自武汉博士德生物工程有限公司, 可溶性单组份 TMB 底物溶液购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.1.2 菌株及血清 菌种 C83644 (O101: K99) 及 K99 兔阳性血清购自中国兽药药品监察所; 新西兰兔阴性血清及猪阴、阳性血清均为山东省滨州畜牧兽医研究院预防兽医学与动物生物技术重点开放实验室制备。

1.2 方法

1.2.1 K99 菌毛蛋白的制备 选用菌株 C83644 (O101: K99), 无菌条件将菌液按照 5%接种到装有 20 mL Minca 培养汤的 100 mL 培养瓶中, 震荡速度为 600 r·min⁻¹, 37℃培养 10 h。收获菌液, 使用高压灭菌过的生理盐水洗涤 3 次并重悬, 60℃水

浴 1 h 同时连续震荡, 离心弃沉淀, 硫酸铵沉淀、透析, 并 SDS-PAGE 检验纯度^[6], Nanodrop 2000/2000C 分光光度计在 260~280 nm 进行蛋白浓度的测定。

1.2.2 酶标板均一性测定 从酶标板中随即抽取 8 条, HRP 标记的 SPA 做 2000 倍稀释包被酶标板, 按照常规程序包被、封闭、显色, 在酶标仪上读出 OD_{450 nm} 值。

1.2.3 PPA-ELISA 反应条件优化 包被抗原浓度选择 1:100、1:200、1:400、1:800, 一抗稀释倍数选择 10、50、100 和 200, 通过方阵法确定最适抗原包被浓度及最适血清稀释倍数; 选择 1%明胶、1% BSA、5%脱脂粉、10%脱脂奶粉 4 种封闭液, 封闭时间选择 0.5、1.0 和 1.5 h, 一抗和二抗反应时间均设定 0.5、1.0 和 1.5 h 共 3 个梯度, 确定一抗和二抗的最佳反应时间; 底物液反应时间设定 5、10 和 15 min, 确定底物的最佳反应时间, 选取的原则是阳性血清 OD_{450 nm} ≈ 1.0, 且阴性血清的 OD_{450 nm} 值较低, 选取 P/N 值最大的各个组合。

1.2.4 猪阳性血清最佳稀释倍数确定 用确定的抗原包被浓度包被 ELISA 板, 猪阳性血清选择 50、100、200、400、800 和 1600 倍稀释, 每个梯度做 2 个重复, 阴性对照同阳性血清选择的梯度相同, 按照确定的 ELISA 方法, 计算 P/N 值, 确定最佳稀释倍数。

1.2.5 CUT-OFF 值的确定 选取 34 份家兔阴性血清, 猪阴性血清 40 份, 用所建立的标准 ELISA 方法进行检测。对猪血清和兔血清分别进行统计学分析, 计算出血清样本平均 OD_{450 nm} 值和标准差 SD, 根据公式 (临界值=样本的平均 OD 值+3×SD) 计算, 分别获得猪血清和兔血清判定标准的临界值。

1.2.6 特异性试验 在相同条件下, 使用大肠埃希氏菌 K88、987P、O101、O139、O8、O149、猪链球菌 2 型阳性血清进行特异性实验, 用 K99 阳性血清作为标准阳性对照, 并设立标准阴性对照。

1.2.7 敏感性试验 在阳性血清最佳稀释度的基础上倍比稀释猪和家兔的阳性血清, 进行间接 PPA-ELISA 检测, 测定 OD_{450 nm} 值, 确定其抗体检出效价, 同时与 K99 纯化抗原致敏绵羊红细胞能够检出的猪和家兔的阳性血清稀释倍数作比较。

1.2.8 重复性试验 (1) 批内重复试验。用同期制备的 K99 抗原包被 ELISA 板, 分别选取 4 份阳性兔血清和阳性猪血清, 并设立标准阴性对照。在同一时间、同一条件, 同一批试验中按照建立的标准间接 ELISA 测定程序测定, 每份血清设定 6 个重复,

进行批内重复。计算同一份血清样品 OD_{450 nm} 值的变异系数 (CV) 以检测板内检测样品的重复性。

(2) 批间重复试验。分别选取 4 份兔血清及 4 份猪血清, 同一批 K99 抗原 4 个不同时间段包被的 ELISA 板, 按照建立的标准 ELISA 检测程序进行测定, 并设立标准阴性对照, 计算同一份血清样品在不同板间 OD_{450 nm} 值, 以检验板间检测样品的重复性。在相同实验条件下, 用 3 批不同时间段制备的 K99 抗原进行 PPA-ELISA 检测, 以检测不同批次抗原批间重复性。

1.2.9 符合性试验 随即选取猪和家兔血清各 20 份, 使用间接血凝方法和建立的标准 PPA-ELISA 方法进行复合性检测, 并计算符合率^[7]。

1.2.10 临床应用 40 只未经免疫的兔子采血, 获得血清, 用所建立的标准化 ELISA 方法进行检测, 测定其 OD_{450nm} 值。随即抽取 40 份猪血清, 用建立的标准化 ELISA 方法进行检测, 测定其 OD_{450nm} 值。

2 结果与分析

2.1 K99 菌毛蛋白的纯化

SDS-PAGE 电泳分析 K99 菌毛蛋白, 显示在 18 ku 处有特异性条带 (图 1)。

2.2 酶标板均一性测定

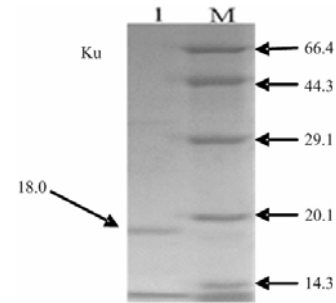
HRP 标记的 SPA 作 2000 倍稀释包被酶标板, 共 96 孔, 每孔 100 μL, 所测 OD_{450nm} 值平均值为 1.980, 标准差为 0.03, 变异系数为 1.7%, 变异系数小于 10%, 能够满足 ELISA 试验的要求。

用 Nanodrop 2000/2000C 分光光度计进行蛋白浓度的测定, 蛋白浓度达到 3.949 mg·mL⁻¹, 且在 260~280 nm 处有良好吸收峰, 蛋白纯度达到 80%。

2.3 PPA-ELISA 反应条件的优化

确定抗原最适包被浓度为 4.94 μg·mL⁻¹ (表 1), 最适封闭液为 10% 脱脂奶粉, 最佳封闭时间为 0.5 h; 兔血清最适稀释倍数为 1:50 (表 1), 猪血清最适稀释倍数为 1:200 (见表 2); 一抗最佳反应时间为 1 h, 二抗最佳反应时间为 0.5 h; 底物的最佳显

色时间为 10 min。



M: 低分子质量蛋白标准; 1: 纯化的 K99 菌毛蛋白
M: Protein Marker; 1: Purified K99 fimbriae protein

图 1 纯化 K99 菌毛蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析
Figure 1 SDS-PAGE of purified K99 fimbriae protein

2.4 CUT-OFF 值的确定

34 份兔血清, 每份做 2 个重复, 取平均值经统计分析, 兔血清阴阳性临界值为 0.25 (表 3), 猪血清阴阳性临界值为 0.35 (表 4)。待检血清样品 OD_{450nm} ≥ 临界值时, 即可判定为阳性。

2.5 特异性试验

应用所建立的标准 PPA-ELISA 检测方法对 K88、987P 等 7 份阳性血清进行特异性检测, 每份阳性血清做 2 个重复, 结果显示 OD_{450nm} 值均在 0.35 以下, 呈阴性反应 (表 5), 说明建立的 ELISA 方法特异性良好。

2.6 敏感性试验

通过所建立的标准 PPE-ELISA 判定标准, 该 ELISA 方法能够检出的兔阳性血清稀释倍数为 1:12800, K99 纯化抗原致敏绵羊红细胞能够检出的兔阳性血清稀释倍数为 1:2560; ELISA 方法能够检出的猪阳性血清稀释倍数为 1:6400, K99 纯化抗原致敏绵羊红细胞能够检出的猪阳性血清稀释倍数为 1:1280。表明该 ELISA 方法具有良好的敏感性, 与间接血凝实验做比较结果说明同一份血清在相同条件下建立的 ELISA 方法要比间接血凝试验敏感度要高。

表 1 抗原最佳包被浓度和血清稀释度的确定

Table 1 Determination of optimal concentration of antigen and dilution of serum

抗原浓度/μg·mL ⁻¹ Concentration of antigen	血清样品稀释度 Dilution of serum sample							
	阳性血清 Positive serum				阴性血清 Negative serum			
	1:10	1:50	1:100	1:200	1:10	1:50	1:100	1:200
39.5	1.981	1.857	1.842	1.837	0.223	0.143	0.125	0.110
19.7	1.461	1.449	1.317	1.456	0.166	0.123	0.118	0.120
9.9	0.784	0.700	0.543	0.644	0.138	0.079	0.085	0.107
4.9	1.234	1.185	1.072	1.127	0.112	0.095	0.092	0.098

表 2 猪阳性血清最佳稀释度

Table 2 The best dilution degrees of pig positive serum

血清阳、阴性 Positive/negative		阳性血清稀释倍数 Positive serum dilution ratio					
		1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
	+	2.09	1.992	1.672	1.41	1.299	0.991
	-	0.3	0.254	0.108	0.113	0.098	0.108
	+	2.132	1.959	1.64	1.363	1.282	0.904
	-	0.298	0.262	0.123	0.116	0.093	0.098
平均 P/N 值 Average value of P/N		7.06	7.66	14.41	12.11	13.52	9.20

表 3 兔血清临界值确定

Table 3 Determination of cut-off of rabbit serums

阴性兔血清 (34 份) Negative serum (34)					阳性血清 Positive serum				
0.036	0.035	0.158	0.075	0.077	0.097	0.092	0.282	0.100	1.873
0.042	0.035	0.096	0.073	0.127	0.101	0.120	0.080	0.115	1.865
0.039	0.036	0.082	0.123	0.126	0.148	0.12	0.185		1.897
0.035	0.036	0.082	0.071	0.091	0.184	0.062	0.059		1.883

表 4 确定猪血清阴阳性临界值

Table 4 Determination of cut-off of porcine serums

猪阴性血清(40 份) Porcine serum (40)					阳性血清 Positive serum			空白对照 Blank control	
0.118	0.251	0.105	0.204	0.09	0.137	0.232	0.13	1.884	0.050
0.172	0.101	0.121	0.09	0.125	0.099	0.154	0.203	1.876	0.052
0.234	0.096	0.245	0.23	0.141	0.241	0.282	0.109	1.853	0.054
0.115	0.226	0.109	0.079	0.077	0.078	0.094	0.145	1.899	0.050
0.265	0.27	0.073	0.118	0.237	0.165	0.084	0.174	1.875	0.051

表 5 PPA-ELISA 特异性试验

Table 5 Specificity of PPA-ELISA

项目 Item	K99 阳、阴性血清 Positive and negative serum of K99		阳性血清 Positive serum							猪链球菌 2 型+ <i>Streptococcus suis</i> type 2
	K99+	K99-	K88+	987P+	O101+	O139+	O8+	O149+		
OD ₄₅₀	1.363	0.089	0.214	0.206	0.159	0.237	0.095	0.103	0.087	
	1.257	0.080	0.198	0.200	0.158	0.228	0.102	0.099	0.085	

表 6 重复性试验结果

Table 6 Reproducible test results

试验样品序号 Tested sample No.	重复次数 Repeat detection times					平均数 Mean value	标准数 SD	变异系数/% CV	
批内 Intra-batch									
1	1.258	1.114	1.134	1.203	1.116	1.123	1.158	0.059	5.1
2	1.076	1.002	1.096	1.103	1.047	1.102	1.071	0.040	3.7
3	0.975	0.992	0.967	1.001	0.998	0.987	0.987	0.013	1.3
4	1.146	1.125	1.136	1.120	1.163	1.047	1.123	0.040	3.5
5	0.106	0.111	0.103	0.094	0.101	0.096	0.102	0.006	6.1
批间 Inter-batch									
6	0.983	0.997	0.986	0.975	0.994	0.998	0.989	0.009	0.9
7	1.256	1.130	1.138	1.252	1.223	1.207	1.201	0.055	4.6
8	1.106	1.164	1.125	1.169	1.114	1.118	1.132	0.027	2.4
9	1.139	1.160	1.156	1.181	1.130	1.175	1.157	0.012	1.7
10	0.175	0.161	0.153	0.140	0.153	0.139	0.154	0.0135	8.8

2.7 重复性试验

4 份猪血清和 4 份兔血清 6 次重复进行批内重复试验, 统计分析显示变异系数介于 1.3%~6.1% 之间; 4 批不同时间段包被的 ELISA 反应板进行批间

试验, 统计数据显示变异系数介于 0.9~8.8 之间(表 6), 不同批次抗原批间重复试验数据变异系数介于 0.55~6.70 (表 7), 表明该 ELISA 方法具有良好的重复性。

表 7 不同批次抗原批间重复试验

Table 7 Intra-batches repeat trials using different batches of antigen

项目 Item	重复次数 Repeat detection times						平均数 Average value	标准数 SD	变异系数/% CV
1	1.127	1.131	1.155	1.141	1.134	1.157	1.141	0.013	1.1
2	1.214	1.256	1.196	1.220	1.251	1.209	1.224	0.024	2.0
3	1.187	1.193	1.189	1.199	1.201	1.185	1.192	0.007	0.55
4	0.112	0.107	0.111	0.103	0.124	0.106	0.111	0.007	6.7

2.8 符合性试验

随即选取的兔、猪各 20 份血清, 用建立的 PPA-ELISA 方法检测 20 份兔血清。其中有 16 份兔血清 OD_{450nm} 值大于 0.25, 猪血清其中有 18 份 OD_{450nm} 值大于 0.35, 其检出的兔血清阳性率为 80%, 猪血清阳性率为 90%; 间接血凝试验检测相同的这 20 份兔、猪血清, 其中兔血清中有 18 份血清发生明显血凝现象, 判定为阳性血清, 猪血清中有 18 份发生明显血凝现象, 其检出的兔血清阳性率为 90%, 猪血清阳性率为 90%。检测兔血清 PPA-ELISA 方法和间接血凝试验符合率 88.9%, 检测猪血清的符合率为 100%。

2.9 临床应用

40 份未经任何免疫的兔子血清用所建立的标准化 ELISA 方法进行检测, 测得的 OD_{450nm} 值有 6 份大于 0.25, 即血清阴性率为 85%。40 份随即抽取的猪血清中有 31 份猪血清的 OD_{450nm} 值大于 0.32, 阳性率为 77.5%。

3 讨论

由产肠毒素性大肠杆菌引起的幼畜腹泻病的发病范围广, 发病率及致死率高, 严重阻碍了畜牧业的发展。因此, 建立一种能够快速、准确检测该病的方法尤为重要。目前, 对 ETEC 致病因子菌毛的血清学检测方法有凝集试验、琼脂扩散试验等, 但 these 方法耗时、费力、灵敏性差、特异性不高^[5,8]。ELISA 因为简便、快速、敏感、特异、重复性好、使用仪器少、适于临床样品的大规模检测等优点而被广泛应用于细菌学、病毒学、寄生虫学、肿瘤学和血清学的诊断和检测。

抗原的纯度直接关系到 ELISA 试验的特异性和敏感性, 粗制的或部分提纯的抗原常常会有超量的杂蛋白, 这些杂蛋白可与抗原竞争有限的载体表

面而降低抗原的有效吸附率, 有时还会导致出现假阳性, 若提高阳性的判定标准, 则有可能出现假阴性^[9]。采用原核表达的方法克隆表达 K99 菌毛蛋白, 理论上是可行的, 但是由于表达过程中构建的载体表达的重组蛋白含有载体自带的标签蛋白, 并且在纯化过程中还要考虑到蛋白变性复性后能否正确折叠、标签蛋白是否切除和纯化过程操作复杂等方面的问题, 所以本研究采取操作简单, 提取菌毛蛋白构像正确的热处理方法制备 K99 菌毛蛋白。通过硫酸铵沉淀、透析纯化蛋白, 将其作为包被抗原, 特异性很强。因此, 以纯化的 K99 菌毛蛋白为包被抗原, 建立检测猪血清中 ETEC 抗体的间接 ELISA 方法是可行的。

本试验中特异性试验部分所测 K88、987P 阴性血清 OD_{450nm} 值分别为 0.214、0.198 和 0.206、0.200, 比较其他阴性血清 OD_{450nm} 值要偏高, 但是均小于 CUT-OFF 值 0.35, 可能是因为外部污染或者血清本身就带有微许共同抗原, 使得 OD_{450nm} 值偏高; 本实验纯化的 K99 菌毛蛋白里有少量杂蛋白, 用该纯化蛋白与各个阳性血清反应, OD_{450nm} 均无阳性, 说明纯化抗原中存在的微量杂蛋白在建立的标准 PPA-ELISA 检测方法和条件的控制下不影响实验结果。

现阶段大部分养猪场在仔猪期间都会对仔猪免疫 ETEC 疫苗, 以用来降低仔猪黄白痢的发病率, 减少因仔猪感染 ETEC 造成的经济损失, 所以送检的猪血清大部分都会显阳性或弱阳性或接近于临界值 0.32, 因此, 检测的 40 份猪血清阳性率 77.5% 完全符合现实情况。

本试验同时用绵羊红血球间接凝集方法和 ELISA 方法检测 K99 菌毛蛋白抗体水平, 进行比较发现不同批次的绵羊红血球重复性较差, 但敏感度与 ELISA 方法相差不大; 而 ELISA 方法在固定各

项参数的基础上,批内和批间重复试验结果良好;作为一种疫苗效力评价的检测方法,ELISA方法要优于传统的间接凝集方法^[10],目前,ELISA应用于各类传染病抗原抗体的检测^[11-12]。

近年来在ELISA的基础上又创建、衍生了多种新的测定方法,如金黄色葡萄球菌A蛋白(SPA)-ELISA;辣根过氧化物酶标记SPA取代酶标第2抗体进行ELISA检测(PPA-ELISA),该方法不但具有更敏感、更特异的特点,而且,可以同时检测小鼠、家兔、猪等多种动物的抗体,因此,既适合疫苗的效力检验,又适合临床大面积免疫监测。

本方法的稳定性试验将另文报道。

参考文献:

- [1] Nagy B, Nagy G, Meder M, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli*, rotavirus, porcine epidemic diarrhoea virus, adenovirus and calici-like virus in porcine postweaning diarrhoea in Hungary[J]. Acta Vet Hung, 1996, 44(1): 9-19.
- [2] 陈祥,高菘,王蕾,等. 华东地区致初生仔猪腹泻大肠杆菌的O血清型和毒力因子[J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 96-100.
- [3] Henton M M, Engelbrecht M M. *Escherichia coli* serotypes in pigs in South Africa[J]. Onder Stepoort J Vet Res, 1997, 64(3): 175-187.
- [4] 袁万哲,何孔旺,陆承平. 检测产肠毒素性大肠杆菌粘附素抗体间接ELISA的建立[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(1): 79-82.
- [5] 何晓杰,侯喜林,余丽芸,等. 产肠毒素大肠杆菌F41菌毛抗体间接ELISA检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2009, 39(4): 333-337.
- [6] Mooif R, DE Graaf F K. Molecular biology of fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1985, 118: 119-138.
- [7] 李书光,李峰,苗立中,等. ETEC菌毛蛋白K88抗体PPA-ELISA检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2012, 33(6): 95-98.
- [8] Mol O, Oudega B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli* [J]. FEMS Microbiol Rev, 1996, 19(1): 25-52.
- [9] Newman R D, Jaeger K L, Wuhib T, et al. Evaluation of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium oocysts* [J]. J Clin Microbiol, 1993, 31(8): 2080-2084.
- [10] 刑应寿,祁克宗,朱良强. ELISA技术在畜产品安全检测中的应用[J]. 动物医学进展, 2004, 25(3): 19-22.
- [11] Chaudhuri P, Prasad R, Kumar V, et al. Recombinant OMP28 antigen-based indirect ELISA for serodiagnosis of bovine brucellosis[J]. Molecular Cellular Probes, 2010, 24(3): 142-145.
- [12] 车建美,刘波,蓝江林. 动物病原大肠杆菌K88的绿色荧光蛋白基因标记及其稳定性研究[J]. 生物技术通报, 2010(9): 198-204.