

猪嗜血支原体酶标单抗阻断 ELISA 检测方法的建立

张长莹,李玉峰*,姜平

(南京农业大学动物疫病诊断与免疫重点开放实验室,南京 210095)

摘要: 为确定猪嗜血支原体(*M. suis*)在临床的感染情况和进行流行病学调查提供检测方法,本研究以纯化的猪嗜血支原体重组 MSG1 蛋白和辣根过氧化物酶标记的 MSG1 蛋白单抗建立了检测猪嗜血支原体的阻断 ELISA 方法。经筛选确定,抗原最佳包被浓度为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,待检血清最佳稀释度为 1:1,作用时间为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 1.5 h,酶标单抗最佳稀释度为 1:10 000,作用时间为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 h。通过对 100 份 *M. suis* 阴性血清阻断 ELISA 检测结果进行统计学分析,确定本方法的判定标准为当阻断率 $\text{PI} \geq 23.71\%$ 时判为阳性, $\text{PI} \leq 36.35\%$ 时判为阴性, $23.71\% < \text{PI} < 36.36\%$ 时判为可疑。敏感性、特异性和重复性试验证明该检测方法敏感性高、特异性强、可重复性好,可用于 *M. suis* 流行病学调查和疾病诊断。

关键词: 猪嗜血支原体;MSG1 蛋白;酶标单抗;阻断 ELISA

中图分类号:S852.62

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2011)11-1591-07

Development of Blocking ELISA for *Mycoplasma suis* with Peroxidase-Labelled Monoclonal Antibody Against MSG1 Protein

ZHANG Chang-ying, LI Yu-feng*, JIANG Ping

(Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology of Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To provide a serological method for detecting antibodies against *Mycoplasma suis* (*M. suis*), a blocking ELISA was developed based on a monoclonal antibody (MAb) to *M. suis*-MSG1 protein. The conditions for each step were optimized. The optimal concentration of the coating antigen was $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; sera samples diluted 1 fold and incubated 1.5 h at $37 \text{ }^\circ\text{C}$; MAb-HRP dilution is 10 000 fold and incubated 1 h at $37 \text{ }^\circ\text{C}$. The blocking results of one hundred *M. suis* negative sera samples were statistically analyzed, and the cutoff of blocking ELISA was determined that the samples presenting a percentage inhibition of $\geq 23.71\%$ were considered positive; samples with a calculated percentage inhibition of $\leq 36.35\%$ were rated negative and those presenting a blocking effect between 23.71% and 36.35% were considered inconclusive. The Blocking ELISA proved to be specific, sensitive and it showed high reproducibility and low variability. This method will be useful in clinical detection and epidemiological study on *M. suis*.

Key words: *Mycoplasma suis*; MSG1 protein; monoclonal antibody; blocking ELISA

猪嗜血支原体(*Mycoplasma suis*)即猪附红细胞体(*Eperythrozoon suis*),可引起猪附红细胞体病

(Eperythrozoonosis)。该病在世界范围内广泛存在,临床主要表现为贫血、黄疸、发热等,常与其它病

收稿日期:2011-02-28

基金项目:公益性行业(农业)科研专项项目(200903036-10)

作者简介:张长莹(1986-),女,山东济南人,硕士生,主要从事动物传染病预防控制研究,E-mail:2009107066@njau.edu.cn

* 通讯作者:李玉峰,副教授,E-mail:yufengli@njau.edu.cn;Tel:025-84395504

原混合感染,发病率低但死亡率高,病愈后的猪可终生携带病原,给养猪业造成了巨大的经济损失^[1]。

根据对猪附红细胞体基因序列(16S rRNA)的分析^[2],现在国际上已经将猪附红细胞体归类于支原体目支原体属,并更名为猪嗜血支原体(*Candidatus Mycoplasma haemosuis*)。由于该病原在体外尚无成熟的培养方法,使其病原学的研究受到了极大限制。2006年 Hoelzle 等用试验感染猪的阳性血清捕捉到猪嗜血支原体的8种特异性抗原蛋白^[4],其中的MSG1(*M. suis* GAPDH-like protein 1)蛋白能够介导猪嗜血支原体与宿主红细胞的黏附作用,且具有糖酵解活性,与病原感染过程的葡萄糖降解相关^[5]。该蛋白很可能是诱发宿主红细胞变形,进而导致患病猪贫血、低血糖的因素之一。作为猪嗜血支原体的关键致病蛋白之一,MSG1蛋白目前已成为研究热点。2007年 Hoelzle 等对MSG1蛋白进行了重组表达,并用重组蛋白免疫猪,发现它能够诱导猪体产生强烈的免疫应答,证明了MSG1蛋白具有良好的抗原性^[6]。

目前已报道的 *M. suis* 血清抗体检测的方法主要包括补体结合试验、间接血凝试验和酶联免疫吸附试验(ELISA)^[3],其中ELISA方法具有操作简便、敏感性高、一次检测样本多、易标准化等特点,已成为常规诊断试剂的首选。由于猪嗜血支原体尚无成熟的体外培养方法,使抗原的来源受到限制,而利用基因工程方法表达重组蛋白可解决抗原来源困难的问题。Hozole 等用猪嗜血支原体重组抗原MSG1蛋白、HspA1蛋白分别建立了间接ELISA检测方法^[7],并证明重组抗原ELISA的敏感性和特异性等同或高于天然抗原ELISA。

检测病原抗体的ELISA方法中,单抗阻断ELISA因能够排除包被抗原中杂蛋白成分的干扰而具有良好的特异性。目前国内外还没有 *M. suis* 相关阻断ELISA检测方法建立的报道。本研究应用已经获得的 *M. suis*-MSG1蛋白单克隆抗体,首次建立了一种能够检测猪嗜血支原体特异性抗体的阻断ELISA方法,同时优化反应条件,并为最终形成诊断试剂盒提供可能。

1 材料与方法

1.1 试剂、菌株、细胞及血清

质粒 pBAD/HisB-msg1 由本实验室构建、保存^[8],宿主菌 Top10,蛋白纯化试剂盒(His Bind

Kits)及蛋白 Marker 均购自 Invitrogen 公司;ELISA Plates 为 Jet Biofil 公司产品;能够特异性分泌抗猪嗜血支原体 MSG1 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株由本实验室制备、鉴定及保存;其它化学试剂为国产分析纯。

M. suis 标准阴、阳性血清为临床送检猪血清,抗体经间接ELISA和Western blotting鉴定,相应血液样品中病原经PCR鉴定^[9]。猪圆环病毒2型(PCV2)、副猪嗜血杆菌(HPs)、猪伪狂犬病病毒(PRV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪瘟病毒(CSFV)、猪脑心肌炎病毒(EMCV)参考阳性血清均由本实验室保存。

1.2 抗原蛋白的制备

将本实验室已构建好的质粒 pBAD/HisB-msg1 转化 Top10 大肠杆菌感受态细胞,涂布氨苄青霉素平板,挑取阳性克隆细菌 Top10/pBAD-msg1,按照文献^[8]构建好的方法用阿拉伯糖进行MSG1蛋白的诱导表达,并按照 His Bind Kits 方法在非变性条件下纯化MSG1重组蛋白。纯化好的蛋白经SDS-PAGE电泳鉴定、核酸定量仪测定浓度后,保存于-20℃,作为检测抗原用。

1.3 单克隆抗体的纯化及辣根过氧化物酶(HRP)标记

本试验用分泌抗猪嗜血支原体MSG1蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞(1A7)制备腹水,将腹水送生物工程公司进行抗体的纯化和HRP标记,对纯化后的抗体进行SDS-PAGE分析和纯度测定,并以直接ELISA法对酶标抗体进行滴定,以对酶标抗体的工作浓度进行初步选择。

1.4 阻断ELISA步骤

用pH 9.6的碳酸盐缓冲液稀释纯化的重组MSG1蛋白,包被96孔高吸附ELISA板,100 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,置于4℃过夜,然后用含有0.05%吐温20的0.05 mol \cdot L⁻¹ PBS(简称PBST,pH7.2)洗3次,每次5 min。加入含5%脱脂乳粉的PBST,200 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,37℃ 2 h 封闭,洗涤同上。加入PBST稀释的待检血清,100 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,37℃作用1 h,洗涤后加入PBST稀释的酶标单抗 HRP-MAb,100 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,37℃作用1 h,洗涤后加入TMB底物溶液,100 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,37℃显色10 min。加入2 mol \cdot L⁻¹ 硫酸50 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 终止反应,用酶标仪读取各孔OD_{450 nm}值。按照以下公式计算阻断率,阻断率(percentage inhibition /PI) = (阴性血清OD_{450 nm}值

一被检血清 OD_{450 nm} 值) / 阴性血清 OD_{450 nm} 值 × 100 %。

1.5 阻断 ELISA 最佳反应条件的选择

1.5.1 抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度的选择 按棋盘法进行,以 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液将抗原蛋白分别稀释至终浓度为 2.0、1.0、0.5、0.25 μg · mL⁻¹,4 °C 过夜包被 ELISA 板。用 PBST 洗涤后加入 1 : 1、1 : 5、1 : 10、1 : 50、1 : 100、1 : 200 稀释的 *M. suis* 标准阳性血清和标准阴性血清,进行阻断 ELISA 检测,每个稀释度重复一次,取其平均值,计算各组阳性血清的阻断率,选择阻断率最高的反应条件作为阻断 ELISA 最佳反应条件。

1.5.2 待检血清作用时间的选择 使用最佳抗原包被浓度包被 ELISA 板,封闭后,加入最佳稀释浓度的待检血清,37 °C 分别作用 0.5、1.0、1.5 和 2.0 h,对标准阴阳性血清进行阻断 ELISA 测定,比较各组阳性血清的阻断率,以选择合适的血清作用时间。

1.5.3 酶标单抗工作浓度的选择 待检血清按最佳条件作用后,洗涤 ELISA 板,根据 1.3 中用直接 ELISA 法滴定的结果将酶标单抗分别用 PBST 按照 1 : 5 000、1 : 10 000、1 : 15 000 和 1 : 20 000 进行稀释,100 μL · 孔⁻¹,对标准阴阳性血清进行阻断 ELISA 测定,比较各组阳性血清的阻断率,以选择合适的酶标单抗工作浓度。

1.5.4 酶标单抗作用时间的选择 将酶标单抗按确定好的稀释倍数加入 ELISA 板后,37 °C 分别作用 20、40、60 和 80 min,对标准阴阳性血清进行阻断 ELISA 测定,比较各组阳性血清的阻断率,以选择合适的酶标单抗作用时间。

1.6 阻断 ELISA 临界值的确定

自猪嗜血支原体阴性猪场采取血液样品,取经间接 ELISA 检测为阴性的猪血清样品 100 份,用阻断 ELISA 检测其阻断率,计算平均值(\bar{x})和标准差(s),以确定结果判定的临界值。

1.7 阻断 ELISA 的重复性试验

使用 5 批不同时间表达和纯化的 MSG1 蛋白包被阻断 ELISA 板,选用经间接 ELISA 检测为 *M. suis* 阴性、弱阳性、强阳性的 3 份试验猪血清,用相同批次和不同批次各 5 个 ELISA 板进行批内和批间重复性试验,计算变异系数。

1.8 阻断 ELISA 的敏感性和特异性试验

从猪 *M. suis* 阳性猪场采取母猪血液样品,对

于 PCR 阳性的母猪分不同时期收集其血清样品,取 50 份经间接 ELISA 检测为阳性的猪血清样品用阻断 ELISA 方法进行检测,根据检测结果判定本方法的敏感性。另外从 *M. suis* 常年阴性猪场采取猪血液样品,取 50 份经间接 ELISA 鉴定为阴性的猪血清样品用阻断 ELISA 方法进行检测,以判定本方法的特异性。

1.9 阻断 ELISA 的交叉反应试验

用阻断 ELISA 对已知猪圆环病毒 2 型(PCV2)、副猪嗜血杆菌(HPs)、猪伪狂犬病病毒(PRV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪瘟病毒(CSFV)、猪脑心肌炎病毒(EMCV)参考阳性血清进行检测,同时设立 *M. suis* 标准阴、阳性对照。

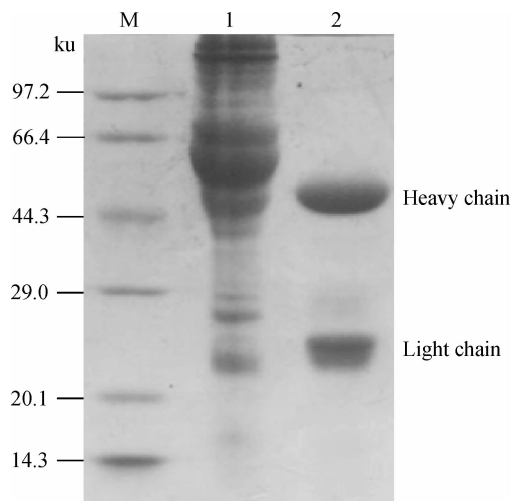
1.10 临床血清样品的检测

应用本试验建立的阻断 ELISA 方法对江苏、浙江、山东、四川、广东等地送检的 310 份临床血清进行检测,以“1.6”中确定的判定标准为依据对检测结果进行判定。

2 结果

2.1 单克隆抗体的纯化和 HRP 标记

腹水经纯化后,单抗的纯度达到 97.6%,腹水纯化前后 SDS-PAGE 分析结果见图 1。用直接 ELISA 法对酶标单抗进行滴定,初步选择出的酶标抗体工作浓度为 1 : 10 000 稀释。



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 1A7 单抗腹水粗品; 2. 纯化的 1A7 单抗样品

M. Protein molecular weight Marker; 1. Crude products of 1A7 MAb ascites; 2. Purified 1A7 MAb

图 1 单抗纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 Analysis of 1A7 monoclonal antibody purification

2.2 阻断 ELISA 最佳反应条件的选择

经过对各种试剂的使用浓度及反应条件进行筛选,最终确定最佳抗原包被浓度为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;

待检血清稀释度为 $1:1$ (表 1), 37°C 作用 1.5 h (表 2);酶标单抗最佳稀释度为 $1:10\ 000$ (表 3),最佳作用时间为 37°C 60 min (表 4)。

表 1 抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度的选择

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

抗原包被浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Concentration of antigen	血清稀释度 Dilution of serum						
		1:1	1:5	1:10	1:50	1:100	1:200
2	P	0.805	0.957	1.603	2.012	2.089	2.109
	N	2.389	2.539	2.485	2.433	2.664	2.497
	PI/%	66.30	62.31	35.49	17.30	21.58	15.54
1	P	0.447	0.621	0.8	0.92	1.184	1.164
	N	2.034	2.205	1.98	1.71	1.876	1.814
	PI/%	78.02	71.84	59.59	46.20	36.89	35.83
0.5	P	0.218	0.215	0.32	0.352	0.388	0.462
	N	1.224	0.917	0.981	0.8	0.726	0.797
	PI/%	82.20	76.55	67.38	56.00	46.55	42.03
0.25	P	0.171	0.19	0.217	0.256	0.287	0.295
	N	0.862	0.767	0.661	0.465	0.465	0.431
	PI/%	80.16	75.23	67.17	44.94	38.28	31.55

表 2 血清最佳作用时间的选择

Table 2 Determination of optimal serum reaction time

血清作用时间/h Serum reaction time	阴性血清 OD _{450 nm} OD value of negative serum	阳性血清 OD _{450 nm} OD value of positive serum	阻断率/% PI
0.5	1.198 5	0.419	65.04
1.0	1.227	0.375 5	69.39
1.5	1.012	0.273	73.02
2.0	0.791	0.281	64.47

表 3 酶标单抗最佳稀释浓度的选择

Table 3 Determination of optimal dilution of HRP-MAb

酶标抗体稀释度 Dilution of HRP-MAb	阴性血清 OD _{450 nm} OD value of negative serum	阳性血清 OD _{450 nm} OD value of positive serum	阻断率/% PI
1:5 000	1.288	0.454	64.75
1:10 000	0.833	0.282	66.14
1:15 000	0.785	0.271	65.48
1:20 000	0.502	0.214	57.37

表 4 酶标单抗最佳反应时间的选择

Table 4 Determination of optimal reaction time of HRP-MAb

酶标抗体工作时间/ min Reaction time of HRP-MAb	阴性血清 OD _{450 nm} OD value of negative serum	阳性血清 OD _{450 nm} OD value of positive serum	阻断率/% PI
20	0.441	0.141	68.03
40	0.785	0.271	65.48
60	0.847	0.259	69.42
80	0.941	0.546	41.97

2.3 阻断 ELISA 临界值的确定

用阻断 ELISA 检测 100 份已知阴性血清, 计算其阻断率, 结果经统计学分析, 计算出血清样品的平均阻断率(\bar{x}) 为 1.55%, 标准差(s) 为 12.63%, $\bar{x} + 2s = 23.71\%$; $\bar{x} + 3s = 36.35\%$, 当 $PI \geq 23.71\%$ 时判为血清抗体阳性反应, $PI \leq 36.35\%$ 时判为血清抗体阴性反应, $23.71\% < PI <$

36.36% 时判为可疑, 需重复检测 1 次, 如果仍低于 36.35% 则判为血清抗体阴性反应。

2.4 阻断 ELISA 的重复性试验

重复性试验结果显示(表 5), 3 份血清在批内和批间试验中的变异系数均小于 10%, 证明该阻断 ELISA 检测方法具有良好的重复性。

表 5 阻断 ELISA 的重复性试验结果

Table 5 The results of repeatability test by blocking ELISA

血清编号 Serum No.	批内重复(阻断率/%) Repeat in the same batch (PI/%)						变异系数/% CV
	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	重复 4 Repeat 4	重复 5 Repeat 5	平均值 Mean value	
1	15.21	14.92	15.66	15.45	16.09	15.46	2.87
2	38.45	39.3	40.69	40.00	40.04	39.69	2.15
3	76.42	80.39	80.59	80.36	78.99	79.35	2.21
血清编号 Serum No.	批间重复(阻断率/%) Repeat in the different batches (PI/%)						变异系数/% CV
	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	重复 4 Repeat 4	重复 5 Repeat 5	平均值 Mean value	
1	14.87	15.08	15.40	16.63	16.03	15.60	4.63
2	39.74	36.53	37.37	41.95	40.63	39.24	5.75
3	83.23	80.62	75.23	80.83	79.61	79.90	3.67

2.5 阻断 ELISA 的敏感性和特异性试验

用阻断 ELISA 方法检测 50 已知 *M. suis* 阳性血清, 结果有 4 份血清检测结果为阴性, 证明本方法的相对敏感性为 92%; 用阻断 ELISA 方法检测 50 已知 *M. suis* 阴性血清, 结果这 50 份血清的检测结果均为阴性, 证明本方法的相对特异性为 100%。

2.6 阻断 ELISA 的交叉反应试验

交叉反应试验结果表明, 除 *M. suis* 阳性血清

为阳性反应外, 其他几种猪病毒参考阳性血清均为阴性反应, 证明该阻断 ELISA 方法可特异性检测 *M. suis* 抗体, 并与其他几种猪病原血清无交叉反应。

2.7 临床血清样品的检测

采用阻断 ELISA 方法对来自江苏、山东、浙江、安徽、四川、广东等地的 310 份送检血清样品进行了检测, 结果显示(表 6) 这些地区送检的血清的 *M.*

suis 抗体阳性检出率为 0~93.68%，总检出率为 52.26%；其中安徽合肥某猪场送检的 95 份血清抗体阳性率较高，说明该猪场 *M. suis* 感染较为严重，

而华东和华南某些地区也存在 *M. suis* 感染的现象。

表 6 阻断 ELISA 对猪场送检血清中 *M. suis* 抗体的检测结果

Table 6 Detection of antibodies to *M. suis* from field pig sera by blocking ELISA

地区 Areas	血清样本数 Count of serum samples	阳性数 Count of positive samples	阴性数 Count of negative samples	阳性检出率/% Positive rate
上海 Shanghai	34	0	34	0
南通 Nantong	55	0	55	0
临沂 Linyi	16	2	14	12.5
衢州 Quzhou	18	13	5	72.22
萧山 Xiaoshan	20	13	7	65
海宁 Haining	20	11	9	55
合肥 Hefei	95	89	6	93.68
自贡 Zigong	32	8	24	25
东莞 Dongguan	20	12	8	60
总计 Total	310	148	162	52.26

3 讨论

由于猪嗜血支原体尚不能在体外培养，给实验室诊断造成了很大困难。国外文献报道的检测猪嗜血支原体抗体的 ELISA 方法^[10-12]，基本上都是通过动物试验，使病原在试验猪体内增殖，然后从猪血液中提取猪嗜血支原体作为检测抗原。这种方法耗时耗力，对试验操作的要求很高，抗原纯度很难保障。虽然已有研究证明除去血液提取病原中的免疫球蛋白(Ig)能够有效提高 ELISA 反应的特异性^[3]，但这些方法很难大规模应用于常规的临床检测。本研究使用的检测抗原是原核表达的重组蛋白 rMSG1，它以可溶的形式存在于细菌中，而且在 N 端带有 His 标签，这有利于重组蛋白的大量纯化，因而解决了抗原来源的问题。使用重组抗原代替全菌作为包被抗原，应用于 ELISA 检测以及制备 ELISA 试剂盒可大大提高不同批次间抗原的稳定性。

目前已经报道的猪嗜血支原体 ELISA 检测方法多为间接 ELISA 方法，原核表达的重组蛋白即使经过纯化回收也难以完全排除大肠杆菌菌体蛋白成分的干扰，而临床猪在生长过程中可能多次感染大肠杆菌，其血清样本中很可能含有大肠杆菌成分的

抗体，所以使用间接 ELISA 方法检测血清抗体很可能造成假阳性的结果而降低了检测方法的特异性。本研究所建立的阻断 ELISA 方法基于待检血清样品抑制酶标单抗与抗原蛋白的结合，以检测病原特异性抗体，不受包被抗原中杂蛋白成分的干扰，因而大大提高了检测的特异性。本试验在进行反应条件优化时，在保证阴、阳性血清阻断结果差异显著的前提下，选择最小稀释倍数作为血清最佳稀释度，目的是为了最大限度地提高阻断 ELISA 的敏感性。敏感性试验中应用阻断 ELISA 方法检测 50 份间接 ELISA 标定为阳性的血清，其中 4 份血清的检测结果为阴性，经数据分析发现此 4 份血清间接 ELISA 检测的 OD 值均为阳性值中较低的，所以不排除这 4 份血清在间接 ELISA 中是假阳性的结果，产生阳性的原因可能是包被抗原中的大肠杆菌杂蛋白和针对大肠杆菌的抗体反应所导致的。

4 结论

所建立的阻断 ELISA 方法与以往猪嗜血支原体抗体检测方法相比具有很多的优势，不但为 *M. suis* 流行病学调查和疾病诊断提供了一种快速有效的检测方法，同时也为 *M. suis* 检测试剂盒的研制

提供了可能。

参考文献:

- [1] MESSICK J B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential [J]. *Vet Clin Pathol*, 2004, 33: 2-13.
- [2] RIKIHISA Y, KAWAHAM M, WEN B. Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA sequences of *H. muris*, *H. felis* and *Eperythrozoon suis* [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(4): 823-829.
- [3] HOELZLE L E, HOELZLE K, RITZMANN M, et al. *Mycoplasma suis* antigens recognized during humoral immune response in experimentally infected pigs [J]. *Vaccine Immunol*, 2006, 13(1): 116-122.
- [4] HOELZLE L E, HOELZLE K, HELBLING M, et al. MSG1, a surface-localised protein of *Mycoplasma suis* is involved in the adhesion to erythrocytes [J]. *Microbes Infect*, 2007, 9: 466-474.
- [5] HOELZLE K, DOSER S, RITZMANN M, et al. Vaccination with the *Mycoplasma suis* recombinant adhesion protein MSG1 elicits a strong immune response but fails to induce protection in pigs [J]. *Vaccine*, 2009, 27: 5376-5382.
- [6] 沈克飞, 尹继刚, 彭 帅, 等. 猪附红细胞体检测方法研究进展 [J]. *中国兽医杂志*, 2008, 44(9): 42-54.
- [7] HOELZLE K, Grimm J, Ritzmann M, et al. Use of recombinant antigens to detect antibodies against *Mycoplasma suis*, with correlation of serological results to hematological findings [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, 14 (12): 1616-1622.
- [8] 缪芬芳, 刘明亚, 李玉峰, 等. 猪附红细胞体 MSG1 蛋白的表达和多克隆抗体的制备 [J]. *畜牧与兽医*, 2010, 42(5): 59-61.
- [9] 张长莹, 张莉莉, 李玉峰, 等. 猪嗜血支原体 PCR 及荧光定量 PCR 检测方法的建立和比较 [J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(6): 443-447.
- [10] SCHULLER W, HEINRITZI K, AL-NUKTHA S, et al. Serologic progression studies using CF and ELISA for the detection of antibodies against *Eperythrozoon suis* infection of swine. I [J]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 1990, 103(1): 9-12.
- [11] HSU F S, Liu M C, CHOU S M, et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Eperythrozoon suis* antibodies in swine [J]. *Am J Vet Res*, 1992, 53(3): 352-354.
- [12] ZHANG S F, JU Y L, JIA L J, et al. Establishment of an efficient enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Eperythrozoon suis* antibody in swine [J]. *J Vet Med Sci*, 2008, 70(10): 1143-1145.

(编辑 白永平)