

doi:

猪流行性腹泻病毒抗体 ELISA 检测方法的建立

赵玉龙^{1,2}, 石 勇^{1,2}, 刘 涛^{1,2}, 吴雅清^{1,2}, 吕茂杰^{1,2},
朱秀同^{1,2}, 张德宝^{1,2}, 马 明^{1,2}, 李卫东^{1,2}

(1. 瑞普(保定)生物药业有限公司, 河北保定 071000; 2. 河北省兽医生物技术工程技术研究中心, 河北保定 071000)

[收稿日期] 2017-07-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 03-0000-00 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 为检测猪血清中猪流行性腹泻病毒(PEDV)抗体水平,以纯化的 PEDV 作为包被抗原,优化 ELISA 反应条件,建立了检测 PEDV 血清 IgG 抗体的诊断方法:当血清 OD_{450nm} 值>0.31 时,判定阳性;当 OD_{450nm} 值小于 0.26 时,判定阴性;当 OD_{450nm} 值介于两者之间判定可疑。本方法为检测猪血清中猪流行性腹泻病毒抗体、监测猪流行性腹泻病的流行情况和评价相关疫苗的免疫效果等提供了帮助。

[关键词] 猪流行性腹泻;猪流行性腹泻病毒;ELISA

Establishment of ELISA Method for Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Antibody

ZHAO Yu-long^{1,2}, SHI Yong^{1,2}, LIU Tao^{1,2}, WU Ya-qing^{1,2}, LV Mao-jie^{1,2},
ZHU Xiu-tong^{1,2}, ZHANG De-bao^{1,2}, MA Ming^{1,2}, LI Wei-dong^{1,2}

(1. Ringpu (Baoding) Biological Pharmaceutical Co., Ltd., Baoding, Hebei 071000, China;

2. Hebei Province Veterinary Biotechnology Engineering Technology Research Center, Baoding, Hebei 071000, China)

Corresponding author: SHI Yong, E-mail: hongxuelange@126.com

Abstract: To evaluate antibody levels of porcine epidemic diarrhea virus in porcine serum, in this study, the purified PEDV virus was used as the coating antigen, and the diagnostic method of detecting IgG antibody of PEDV was established by optimizing the ELISA reaction condition. The serum OD_{450 nm} value was 0.31, the positive value was determined, the OD_{450 nm} value was less than 0.26, the negative value was determined; and the OD_{450 nm} value between the two to determine suspicious. The method is helpful to detect the prevalence of porcine epidemic diarrhea antibody in swine serum, to monitor the epidemic situation of the disease and to evaluate the immune effect of related vaccine.

Key words: porcine epidemic diarrhea; porcine epidemic diarrhea virus; ELISA

基金项目: 河北省科技计划项目(17826615D)

作者简介: 赵玉龙, 硕士, 兽医师, 从事兽用生物制品方面研究。

通讯作者: 石 勇。E-mail: hongxuelange@126.com

猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)可引起猪以腹泻、呕吐、脱水和哺乳仔猪高致死率(80%~100%)为特征的高度接触性肠道传染病^[1-3]。该病自 1971 年首次发现,随后在世界多个国家出现了该病的报道^[4-6]。近年来我国呈现了不断扩散和暴发的趋势^[7-10],给养猪业造成了巨大的经济损失。

目前猪流行性腹泻病原的诊断方法有 RT-PCR 法、荧光定量 PCR 法、ELISA 法、免疫荧光法等^[11],猪流行性腹泻抗体的检测方法有免疫荧光法、ELISA 法和中和抗体试验法等^[12]。其中免疫荧光抗体法和中和抗体试验对试验仪器要求高,检测周期较长,检测成本高,不利于在基层推广。而 ELISA 方法具有成本低、安全、敏感性高,特异性强、对仪器要求相对低的特点,方便在基层推广使用。本研究以纯化的 PEDV 全病毒为包被抗原,通过优化 ELISA 反应条件,建立了检测 PEDV 血清 IgG 抗体的诊断方法,为监测该病的流行情况和评价相关疫苗的免疫效果提供了帮助,方便在基层检测的需要。

1 材 料

猪流行性腹泻病毒毒液(ZJ08 株、保定瑞普生产,经检测病毒含量 106.5TCID₅₀/mL)猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪瘟病毒(CSFV)、伪狂犬病毒(PRv)标准阳性血清均瑞普(保定)生物药业有限公司提供。酶标板购自 NUNC 公司;HRP 标记羊抗猪 IgG 酶标抗体购自 KPL 公司(批号 10174022)。

2 方 法

2.1 PEDV 全病毒抗原蛋白和标准阴阳性血清的制备

2.1.1 PEDV 全病毒制备 取 500 mL PEDV 毒液(病毒含量 106.5TCID₅₀/mL)反复冻融 3 次,加入 50 mL 的 Triton X-100,室温振荡 10 min。用高速冷冻离心机 4 ℃、6000 r/min 离心 15 min,取离心上清液于超速冷冻离心机 40000 r/min 离心 4 h,沉淀充分溶解于 25 mL PBS 溶液中,即为 PEDV 全病毒抗原。用 BCA 法测定抗原浓度后,分装,-20 ℃

保存。

2.1.2 PEDV 参考阴阳性血清制备 采取 30 日龄 SPF 健康仔猪的血液分离血清作为参考阴性血清;将 PEDV 疫苗接种 30 日龄 SPF 健康仔猪,首免间隔 7 d 加强免疫,加强免疫后 4 周采集血液分离血清作为参考阳性血清;用纯化的全病毒抗原 1:5 稀释作为检测抗原,以参考阴性血清和生理盐水作为对照、参考阳性血清做 1:16、1:32、1:64、1:128 梯度稀释进行琼脂扩散试验测定效价,效价检测合格后作为本研究的标准阳性血清和标准阴性血清。

2.2 ELISA 方法的一般程序 以碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释抗原,100 μL/孔 4 ℃ 包被过夜;纯化水洗板 3 次,加入封闭液 200 μL/孔,37 ℃ 封闭 2 h,纯化水 2 洗板 4 次,自然干燥。用样品稀释液稀释一抗血清,100 μL/孔加入酶标板中,37 ℃ 作用 60 min,取出后用 PBST 洗液洗板 5 次;用酶标抗体稀释液对酶标抗体进行稀释,100 μL/孔,37 ℃ 作用 60 min,取出后用 PBST 洗液洗板 5 次;加入 TMB 显色液 100 μL/孔,室温避光反应 15 min;加入终止液 50 μL/孔;酶标仪 450 nm 处读取各孔读数。

2.3 ELISA 反应条件的优化

2.3.1 抗原最适包被浓度和待检血清最佳稀释浓度的确定 采用方阵滴定法,横排做抗原包被浓度稀释,纵排做血清 1:100、1:200、1:400 倍比稀释。使用酶标抗体建议工作浓度进行 ELISA 测定,以阳性血清值为 1.0 左右、阴性血清值小于 0.2、P/N 最大者确定为最佳包被浓度和血清稀释倍数。

2.3.2 包被方式的优化 以最适抗原浓度,用 3 种方式进行酶标板包被:4 ℃ 过夜、37 ℃ 2 h 后 4 ℃ 过夜和 37 ℃ 2 h。封闭后按确定的血清稀释倍数进行 ELISA 测定,以阳性血清值为 1.0 左右、阴性血清值小于 0.2、P/N 最大者确定为最佳包被方式。

2.3.3 封闭液的选择 分别用 1% BSA、5% 脱脂乳、1% 酪蛋白作为封闭剂,封闭后按照优化的试验条件进行 ELISA 测定,以 P/N 最大者确定为最佳封闭液。

2.3.4 抗原抗体最佳作用时间确定 待检血清(一

抗)37℃分别作用30 min、60 min、90 min、120 min 进行 ELISA 测定,以 P/N 最大者确定为一抗最佳反应时间。

2.3.5 酶标抗体最佳作用时间确定 酶标抗体 37℃作用时间分别为 30 min、60 min、90 min 和 120 min 进行 ELISA 测定,以 P/N 最大者确定为酶标抗体最佳反应时间。

2.3.6 酶标抗体工作浓度优化 酶标抗体分别做 1 : 1000、1 : 2000、1 : 3000 和 1 : 4000 稀释进行 ELISA 测定,以 P/N 最大者确定为酶标抗体工作液最佳反应时间。

2.3.7 TMB 底物反应时间的确定 加入 TMB 底物后,分别避光反应 5 min、10 min、20 min、30 min 进行 ELISA 测定,以 P/N 值最大者判定 TMB 底物最佳反应时间。

2.4 血清阴阳性临界值的确定 按照建立的检测方法对 30 份 PEDV 阴性猪血清进行 ELISA 测定,计算各血清 OD_{450 nm} 值平均值和标准差 s。根据统计学原理,OD_{450 nm} 值 ≥ +3s 时,判为阳性;OD_{450 nm} 值 ≤ +2s 时,判为阴性,介于二者之间者判为可疑。

2.5 建立的 ELISA 检测试剂盒验证

2.5.1 敏感性试验 选取 6 份不同的 PEDV 阳性血清,同时设立标准阳性和标准阴性对照血清,在稀释 100 倍的基础上分别进行倍比稀释至 1 : 1600,检测所建立方法的敏感性。

2.5.2 特异性试验 选取猪圆环病毒 2 型(PCV-2)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪瘟病毒(CSFV)、伪狂犬病毒(PRV)标准阳性血清按照优化的血清稀释倍数稀释后进行 ELISA 检测,确定上述血清是否会与建立的试剂盒发生交叉反应。

2.5.3 批内重复试验 用同一批制备的抗原包被 A 板,检测 5 份不同抗体水平的阳性血清和 3 份标准阴性血清,分别第 1、3、7 天进行 ELISA 重复测定,每份血清平行做 2 孔,对结果进行统计学分析。

2.5.4 批间重复试验 用不同批次抗原制备三批次检测试剂盒,分别检测 5 份不同抗体水平的阳性血清和 3 份阴性血清,每份血清平行做 2 孔,对结

果进行统计学分析。

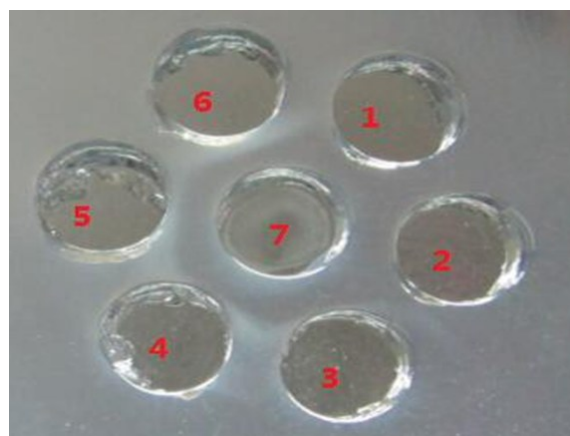
2.6 试剂盒的初步应用 对同一猪群,采集 8 份未免疫 PEDV 疫苗猪血清和 16 份免疫 PEDV 疫苗猪血清,用建立的检测方法进行 ELISA 测定,区分免疫前后血清阴阳性。

3 结果

3.1 PEDV 全病毒抗原蛋白和标准阴阳性血清的制备

3.1.1 全病毒蛋白浓度测定 用 BCA 法测定所制备的蛋白浓度为 2.4 mg/mL。

3.1.2 PEDV 参考阴性血清和参考阳性血清制备 测定的参考阴性血清效价为 0,参考阳性血清效价达到 1 : 256。结果见图 1。



1 孔:生理盐水;2 孔:参考阴性血清孔;3-6 孔:参考阳性血清 1 : 256、1 : 128、1 : 64、1 : 32 稀释;7 孔:PEDV 抗原
Hole 1:Physiological saline;Hole 2:Reference negative serum;
Hole 3-6:Reference positive serum 1 : 256, 1 : 128,
1 : 64, 1 : 32 dilution;Hole 7:PEDV antigen

图 1 琼脂扩散试验测定参考血清效价
Fig 1 Detecting the titer of antiserum
by agar diffusion reaction

3.2 ELISA 反应条件优化

3.2.1 抗原包被浓度和血清稀释倍数的优化 结果表明,当抗原进行 1 : 1000 稀释(包被浓度 2.4 ug/mL)、血清进行 1 : 200 稀释时检测 P/N 值最大,检测效果最佳。结果见表 1。

表 1 抗原包被浓度和血清稀释倍数的优化结果

Tab 1 Optimal results of antigen coating concentration and serum dilution factor									
抗原稀释倍数	血清 1：100 稀释			血清 1：200 稀释			血清 1：400 稀释		
	阳性血清	阴性血清	P/N 值	阳性血清	阴性血清	P/N 值	阳性血清	阴性血清	P/N 值
1:250	1.928	0.253	7.62	1.693	0.187	9.05	1.316	0.151	8.72
1:500	1.613	0.224	7.2	1.518	0.143	10.62	1.204	0.127	9.48
1:750	1.448	0.182	7.96	1.294	0.128	10.11	1.103	0.108	10.21
1:1000	1.397	0.158	8.84	1.256	0.09	13.96	0.995	0.081	12.28
1:2000	0.936	0.12	7.8	0.831	0.081	10.26	0.731	0.07	10.44

3.2.2 包被方式的优化 当采取 37 ℃ 2 h +4 ℃ 过夜的方式进行包被时,P/N 值最大,检测效果最佳,因此确定为最佳包被条件。结果见表 2。

表 2 包被方式优化结果

Tab 2 Optimal results of coating mode			
包被方式	阳性血清	阴性血清	P/N 值
4 ℃ 过夜	1.356	0.085	15.95
37 ℃ 2 h	1.214	0.081	14.99
37 ℃ 2 h+4 ℃ 过夜	1.473	0.076	19.38

3.2.3 封闭液的选择优化 当采用 5%脱脂乳作为封闭液时,P/N 值最大,酶标板封闭效果要好。结果见表 3。

表 3 封闭液优化结果

Tab 3 Optimal results of closed liquid			
封闭方式	阳性血清	阴性血清	P/N 值
1%BSA	1.261	0.085	14.84
5%脱脂乳	1.317	0.062	21.24
1%酪蛋白	1.113	0.082	13.57

3.2.4 待检血清最佳反应时间优化 当血清反应时间为 60 min 时,P/N 值最大。因此最佳反应时间为 60 min。结果见表 4。

3.2.5 酶标抗体工作液最佳反应时间优化 当酶标抗体工作液反应时间为 30 min 时 P/N 值最大。因此确定酶标抗体工作液最佳反应时间为 30 min。结果见表 5。

表 4 待检血清反应时间优化结果

Tab 4 Optimal results of serum response time			
血清反应时间/min	阳性血清	阴性血清	P/N 值
30	1.161	0.068	17.07
60	1.317	0.068	19.37
90	1.303	0.072	18.1
120	1.378	0.09	15.31

表 5 酶标抗体工作液最佳反应时间优化结果

Tab 5 Optimal results of enzyme-labeled antibody working solution			
酶标抗体反应时间/min	阳性血清	阴性血清	P/N 值
30	1.134	0.066	17.18
60	1.254	0.07	17.91
90	1.303	0.086	15.15
120	1.378	0.105	13.12

3.2.6 酶标抗体工作浓度优化 当酶标抗体工作浓度 1：3000 时,P/N 值最大,因此酶标抗体工作液工作浓度确定为 1：3000。结果见表 6。

表 6 酶标抗体工作浓度优化结果

Tab 6 Optimal results of enzyme labeled antibody working concentration			
酶标抗体工作浓度	阳性血清	阴性血清	P/N 值
1：1000	1.634	0.136	12.01
1：2000	1.554	0.09	17.27
1：3000	1.383	0.076	18.2
1：4000	1.142	0.068	16.79

3.2.7 TMB 底物反应时间优化 当底物反应 10 min 时,P/N 值最大,因此 TMB 底物最佳反应时间为 10 min。结果见表 7。

表 7 TMB 底物反应时间优化结果

Tab 7 Optimal results of TMB substrate reaction time			
TMB 反应时间/min	阳性血清	阴性血清	P/N 值
5	0.934	0.068	13.74
10	0.293	0.07	18.47
20	1.383	0.096	14.41
30	1.565	0.126	12.42

3.3 血清阴阳性临界值的确定 用优化的试剂盒对 30 份阴性血清进行 ELISA 测定,结果见表 8。计算所得阴性血清平均值 =0.158,标准差 s=0.51,计算 +2s=0.26; +3s=0.31。因此当测得血清 OD_{450nm} 值>0.31 时,判定阳性;当测得 OD_{450nm} 值小于 0.26 时,判定阴性;测得 OD_{450nm} 值介于两者之间判定可疑。

3.4 建立的 ELISA 检测试剂盒验证

3.4.1 敏感性验证 检测 6 份阳性血清,分别倍比稀释,可检测出 OD_{450nm} 值随血清稀释倍数增加呈现递减规律。结果表明试剂盒可以区分不同效价水平阳性血清。结果见表 8。

表 8 试剂盒敏感性试验

Tab 8 The result of Kit sensitivity test								
血清稀释度	血清 1	血清 2	血清 3	血清 4	血清 5	血清 6	标准阳性	标准阴性
1 : 100	1.814	1.017	3.789	0.845	1.543	2.546	2.715	0.227
1 : 200	1.416	0.754	3.287	0.652	1.124	2.263	2.152	0.168
1 : 400	0.954	0.628	2.659	0.496	0.895	1.659	1.734	0.102
1 : 800	0.627	0.473	1.945	0.354	0.694	1.012	1.263	0.084
1 : 1600	0.465	0.304	1.514	0.298	0.428	0.861	0.845	0.056

3.4.2 特异性试验 ELISA 检测猪圆环病毒 2 型 (PCV-2)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪瘟疫病毒 (CSFV)、伪狂犬病毒 (PRV) 标准阳性血清,血清检测值 OD_{450nm} 值均小于 0.26,表明上述血清不与建立的 PEDV 抗体 ELISA 检测方法发生交叉反应。结果见表 9。

表 9 特异性试验结果

Tab 9 The result of specific test		
血清	OD _{450nm} 值	判定
PCV2 血清	0.156	阴性
PRRSV 血清	0.121	阴性
CSF 血清	0.196	阴性
PRV 血清	0.147	阴性
PEDV 阳性血清	2.012	阳性
PEDV 阴性血清	0.091	阴性

3.4.3 批内重复试验 对同一份血清分别在 1、3、7 d 检测,共选取 8 份血清。结果显示,每份血清检测结果变异系数在 2.25%~7.98% 之间,均小于 10%,表明建立的 ELISA 方法批内稳定。结果见表 10。

3.4.4 批间重复试验 对同一份血清分别在用 3 个批次制备的试剂盒检测,共选取 8 份血清。结果表明每份血清检测结果变异系数在 2.91%~8.33% 之间,均小于 10%,表明建立的 ELISA 方法不同批次间稳定。结果见表 11。

3.5 试剂盒初步应用 采集的未免疫 PEDV 疫苗的血清 8 份和免疫 PEDV 疫苗血清 16 份进行检测,结果见表 12。检测结果表明 8 份未免疫 PEDV 疫苗的血清全部为阴性,16 份免疫 PEDV 疫苗血清全部呈阳性,表明建立的 ELISA 方法可以区别 PEDV 抗体阴阳性。

表 10 试剂盒批内重复试验结果

Tab 10 The result of reagent test in the kit batch						
样品血清	1 d 检测	3 d 检测	7 d 检测	平均值	方差	变异系数 C.V
阳性 1	1.596	1.495	1.556	1.549	0.05	3.28%
阳性 2	0.887	1.012	0.956	0.952	0.06	6.58%
阳性 3	3.012	2.987	3.116	3.038	0.07	2.25%
阳性 4	2.431	2.096	2.296	2.274	0.17	7.41%
阳性 5	1.199	1.303	1.256	1.253	0.05	4.16%
阴性 1	0.189	0.166	0.193	0.183	0.01	7.98%
阴性 2	0.086	0.092	0.082	0.087	0.01	5.81%
阴性 3	0.196	0.189	0.187	0.191	0	2.48%

表 11 试剂盒批间重复试验

Tab 11 The result of reagent intermittent test						
样品血清	第 1 批检测	第 2 批检测	第 3 批检测	平均值	方差	变异系数 C.V
阳性 1	1.596	1.795	1.533	1.641	0.14	8.33%
阳性 2	0.887	0.912	1.013	0.937	0.07	7.12%
阳性 3	3.012	2.887	3.054	2.984	0.09	2.91%
阳性 4	2.431	2.145	2.167	2.248	0.16	7.08%
阳性 5	1.199	1.403	1.356	1.319	0.11	8.10%
阴性 1	0.189	0.176	0.176	0.18	0.01	4.16%
阴性 2	0.086	0.076	0.086	0.083	0.01	6.98%
阴性 3	0.196	0.184	0.212	0.197	0.01	7.12%

表 12 试剂盒初步应用-临床血清检测结果

Tab 12 Kit preliminary application-clinical serum test results								
临床血清	OD _{450nm} 值							
阴性血清 1-8	0.225	0.187	0.113	0.146	0.195	0.089	0.172	0.082
阳性血清 1-8	1.458	1.234	2.045	0.897	1.348	0.961	1.542	1.451
阳性血清 9-16	2.236	0.989	1.514	1.234	1.696	1.234	0.889	2.211

4 讨 论

猪流行性腹泻对仔猪有很高的感染性和致死性,我国自 2010 年以来,PED 多呈发病突然,传播速度快,流行范围广和持续性长、仔猪普遍获得的母源抗体不足的特点^[13-14]。由于本病无特效药,因此对我国养猪业造成巨大经济损失。因此建立一种方便、经济的试验诊断方法符合市场需求。

目前国内已经报道了利用 PEDV 重组 S 蛋白和 N 蛋白作为抗原建立的 ELISA 方法^[15-16]。重组蛋白经过纯化具有相对特异性高的特点,但是也会

存在表达蛋白为包涵体^[17]或表达量低的情况。此外重组蛋白也存在因为毒株不同造成同源蛋白差异大,影响检出率。全病毒蛋白作为包被抗原含有所有的抗原位点,相比重组蛋白具有更高的阳性检出率^[18-19]。随着新的培养基和生产工艺的研究和使用,PEDV 培养难度降低,克服了之前报道中提到的全病毒获得困难的问题。本研究使用的 PEDV 病毒液效价达到 6.5,可以满足酶标板制备的需要。通过超速离心获得纯化的全病毒蛋白作为包被抗原,建立了一种检测猪流行性腹泻病毒抗体的

ELISA 方法,通过初步应用,可以区分猪血清抗体阴阳性及抗体水平高低,并且批内批间稳定。本方法对于监控血清抗体变化和筛选感染猪、评价 PEDV 疫苗免疫效果提供了帮助。

参考文献:

- [1] Pensaert M B, Bouck D P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. Archives of Virology, 1978, 58 (3): 243-247.
- [2] Straw B E. Diseases of Swine[M]. 8th Edition. Translated by Zhao D M, Zhang Z Q, Shen J Z. Beijing: China Agricultural University Press, 2000: 181-187.
- [3] 张强敏,郭福生,尹燕博,等. 猪流行性腹泻病毒分子生物学特征[J]. 中国病毒学, 2002, 17(4): 381-384.
Zhang M Q, Guo F S, Yin B Y, *et al.* Molecular biological characteristics of porcine epidemic diarrhea virus[J]. Virologica Sinica, 2002, 17(4): 381-384.
- [4] Ducatelle R, Cousement W, Debouck P, *et al.* Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets electron microscopic study[J]. Vet Pathol, 1982, 19(1): 57-66.
- [5] Horvath T, Mocsari E. Ultrastructural changes in the small intestinal epithelium of suckling pigs affected with a transmissible gastroenteritis (TGE)-like disease[J]. Arch Viro, 1981, 68(2): 103-113.
- [6] Park S J, Moon H J, Yang J S, *et al.* Sequence analysis of the partial spike glycoprotein gene of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korean[J]. Virus Genes, 2007, 35(2): 324-332.
- [7] Fan J, Zuo Y Z, Li J H, *et al.* Heterogeneity in membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in China[J]. Virus Genes, 2012, 45(1): 113-117.
- [8] Sun R Q, Cai R J, Chen Y Q, *et al.* Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(1): 161-163.
- [9] 张桂红.猪流行性腹泻病毒地方株 LJB/03 株分离鉴定[D].东北农业大学学位论文, 2008.
Zhang G H. Isolation and identification of the local strain of porcine epidemic diarrhea virus LJB/03[D]. Northeast Agricultural University, 2008.
- [10] 陈慧娟. 猪流行性腹泻病毒河南株生物学特性研究及 FQ-PCR 检测方法的建立[D]. 河南农业大学学位论文, 2014.
Chen H J. Porcine epidemic diarrhea virus of Henan strain biological characteristics and the establishment of FQ-PCR method [D]. Henan Agricultural University, 2014.
- [11] 宋 聪,刘 宁,姚 俊,等. 猪流行性腹泻病毒的实验室检测方法和生产防控措施[J]. 养猪 2015, 4:93-96.
Song C, Liu N, Yao J, *et al.* Laboratory detection methods and production control measures of porcine epidemic diarrhea virus [J]. Swine Production, 2015, 4:93-96.
- [12] 石明明. 猪流行性腹泻病毒(PEDV)及其抗体检测方法的研究与应用[D]. 南京农业大学, 2012.
Shi M M. Investigation and application of virus and serological detection methods of porcine epidemic diarrhea virus[J]. Nanjing Agricultural University, 2012.
- [13] 李 龙. 仔猪流行性腹泻的最新流行情况[J]. 养猪, 2011 (5): 87-88.
Li L. The latest epidemic of piglet porcine epidemic diarrhea[J]. Swine Production, 2011(5): 87-88.
- [14] 甘振磊,汤德元,李春燕,等. 猪流行性腹泻流行特点及流行现状的研究[J]. 猪业科学, 2010(12): 24-28.
Gan Z L, Tang D Y, Li C Y, *et al.* Epidemic characteristics and prevalence of swine epidemic diarrhea[J]. Swine Industry Science, 2010(12): 24-28.
- [15] 邓祖丽. 基于 S 蛋白检测猪流行性腹泻抗体间接 ELISA 方法的建立[J]. 河南农业科学, 2013, 42(8): 119-123.
Deng Z Y. Prokaryotic expression of PEDV S protein and development of indirect ELISA for detection of its antibody[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2013, 42(8): 119-123.
- [16] 姜艳平,姜新鹏,孙刘妹,等. 猪流行性腹泻病毒重组 N 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(2): 119-122.
Jiang Y P, Jiang X P, Sun L M, *et al.* An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus using recombinant N protein as coating antigen[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2015, 37(2): 119-122.
- [17] 华 耀,王 玮,李 郁,等. 猪流行性腹泻病毒 S 蛋白主要抗原表位区的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 微生物学通报, 2016, 43(2): 434-443.
Hua Y, Wang W, Li Y, *et al.* Prokaryotic expression of the structural protein s of porcine epidemic diarrhea virus and establishment of an indirect ELISA for an detection of antibody against porcine epidemic diarrhea [J]. Microbiology China, 2016, 43 (2): 434-443.
- [18] Carvajal A, Diego R, Lanza I, *et al.* Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies[J]. Vet Diagn Invest, 1995, (7): 60-64.
- [19] Kwon C H, Kwon B J, Kang Y B, *et al.* Cell adaptation of KPEDV-9 and serological survey on porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Korea[J]. Vet Res, 1994, 33: 249-254.