



利用 InlB 蛋白检测小鼠血清中产单核细胞李氏杆菌抗体的间接 ELISA 建立

宁文晴^{1,2}, 樊沪成², 张文鑫¹, 杨晓雯^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 农业农村部动物生物安全风险预警及防控重点实验室(北方), 北京 100193; 2. 山东农业大学动物医学院, 泰安 271000)

摘要: 旨在建立一种快速有效的检测产单核细胞李氏杆菌(LM)感染样品的间接 ELISA 方法。本研究采用原核表达系统体外诱导表达 InlB 蛋白, 通过优化并确定间接 ELISA 方法的最佳参数, 建立间接 ELISA 方法。本研究发现, 利用 pCold II -10×His 载体能够可溶性表达 InlB 蛋白; 棋盘法优化后的条件为 InlB 蛋白包被浓度为 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 10% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 血清最适稀释倍数为 1:400, 37 °C 孵育 1 h, 酶标二抗最佳稀释度为 1:2 500, 37 °C 避光显色 8 min, 阴阳性临界值为 0.37。本研究建立的间接 ELISA 方法仅与产单核细胞李氏杆菌阳性血清反应, 当血清稀释度为 1:800 时检测仍为阳性; 批内重复变异系数为 2.79%~6.64%, 批间重复的变异系数为 2.61%~7.75%, 重复性好; 与商品化试剂盒相比, 整体符合率为 95.83%。本研究建立的 LM 感染样品的间接 ELISA 检测方法特异性强, 敏感性高, 可用于产单核细胞李氏杆菌感染样品的快速检测, 为李斯特菌病的监测提供参考。

关键词: 产单核细胞李氏杆菌; InlB 蛋白; 间接酶联免疫吸附试验

中图分类号: S852.61; S854.43

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)03-1766-06

Establishment of an Indirect ELISA for Detecting Antibodies against *Listeria monocytogenes* in Mouse Serum Using the InlB Protein

NING Wenqing^{1,2}, FAN Hucheng², ZHANG Wenxin¹, YANG Xiaowen^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Biosafe Risk Prevention and Control (North), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian 271000, China)

Abstract: This study aimed to establish a rapid and effective indirect ELISA method for detecting *Listeria monocytogenes* infection in samples. The InlB protein was expressed and purified in vitro using a prokaryotic expression system. The optimal parameters for the indirect ELISA method were determined through optimization, an indirect ELISA method was established. Soluble expression of InlB protein was achieved using the pCold II-10 × His vector. Optimal conditions determined by a grid-screen method were: InlB protein coating concentration of $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, blocking with 10% skim milk powder at room temperature for 2 hours, optimal serum dilution of 1:400, incubation at 37 °C for 1 hour, the optimal dilution for the secondary antibody was 1:2 500, with incubation at 37 °C in the

收稿日期: 2025-05-27

基金项目: 国家重点研发计划(2024YFD1800301); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-CSLPDCP-202403; ASTIP-IAS-15)资助; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Y2025YC47)

作者简介: 宁文晴, 硕士生, 主要从事人兽共患病防控、耐药及致病机制方面的研究, E-mail: m17662631372@163.com; 樊沪成, 硕士生, 主要从事水禽疫病防控、分子机制及疫苗研制方面的研究, E-mail: m17568030971@163.com。宁文晴和樊沪成为同等贡献作者

* 通信作者: 杨晓雯, 主要从事布鲁氏菌病防控、致病及耐药机制的研究, E-mail: yangxiaowen01@caas.cn

dark for 8 min. The positive/negative cutoff value was determined to be 0.37. The indirect ELISA method established in this study reacted only with *L. monocytogenes*-positive sera, maintaining positive detection at a serum dilution of 1:800. The coefficient of variation (CV) for intra-batch replicates ranged from 2.79% to 6.64%, while the CV for inter-batch replicates ranged from 2.61% to 7.75%. Compared with a commercial kit, the overall agreement rate was 95.83%. The indirect ELISA method established in this study for detecting *L. monocytogenes*-infected samples exhibits high specificity, sensitivity, and reproducibility. It can be used for rapid detection of *L. monocytogenes*-infected samples, providing a reference for monitoring listeriosis.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; inlB protein; indirect ELISA

* **Corresponding author:** YANG Xiaowen, E-mail: yangxiaowen01@caas.cn

产单核细胞李氏杆菌(*Listeria monocytogenes*)简称单增李斯特菌(LM)^[1],是一种人畜共患的革兰阳性胞内寄生菌,LM感染的快速诊断对及时采取最佳治疗方案至关重要。近年来,多种快速检测技术不断发展。已有研究报道基于内化素C(InlC)和李斯特溶血素O(LLO)合成肽作为抗原的血清学检测方法用于山羊LM感染的诊断^[2],此外,实验室诊断中,血清学检测(如检测抗李斯特菌赖氨酸O抗体)、实时荧光定量PCR等技术展现出显著优势^[3-5]。内化素B(internalin B, *inlB*)是仅存在于LM的重要毒力因子^[6-8],*inlB*基因可以通过N端亮氨酸重复序列(LRRs)结合宿主细胞表面的酪氨酸激酶受体Met(肝细胞生长因子受体),激活下游信号通路,诱导细胞骨架重排,从而促进细菌内化至非吞噬细胞内^[9-10]。在检测方法研究中,基于InlB蛋白的间接ELISA方法鲜有报道。因此,本研究利用pCold II -10×His载体体外可溶性表达并纯化InlB蛋白,优化条件并建立一种更加特异、灵敏且快速有效地检测李斯特菌病临床样品的间接ELISA方法,为李斯特菌病的监测和诊断提供参考。

1 材料与方法

1.1 血清、菌株和载体

LM小鼠阳性血清、LM灭活菌液由北京农学院王相国团队赠予,小鼠源血清(布鲁氏菌阳性血清、产气荚膜梭菌ε蛋白阳性血清、结核阳性血清、阴性血清)以及pCold II -10×His载体均由本团队提供。

1.2 主要试剂

ProteinFind® Goat Anti-Mouse IgG (H+L), HRP Conjugate 和 Blue Plus® IV Protein Marker(全式金), Ni NTA beads(天地人和), PrimeSTAR HS DNA Polymerase(宝日生物), 2×Rapid Taq

Master Mix(诺唯赞), Western一抗稀释液(碧云天)、单增李斯特菌ELISA试剂盒(钦诚生物)。

1.3 主要仪器

四维旋转混合仪BE-1100(海门其林贝尔), 超声波细胞粉碎机SCIENTZ-IIID(宁波新芝生物), T100™ PCR仪(伯乐公司), PowerPac™ 基础电泳仪电源(伯乐生命医学产品(上海)有限公司), 酶标仪、超净工作台(泽恒计量), 恒温金属浴(上海一恒), 全温振荡培养箱(上海旻泉)。

1.4 引物设计

参考NCBI收录的*Listeria monocytogenes* EGD的*inlB*基因序列(HG421741), 设计特异性引物(表1)。重组质粒使用pCold-F以及pCold-R进行阳性鉴定(表1)。

1.5 重组蛋白的制备

参照文献[11]所述方法,以LM灭活菌液为模板对*inlB*基因进行PCR扩增。将阳性质粒和pColdII-10×His空载质粒分别转化至BL21感受态细胞并增殖培养,当OD_{600nm}值为0.6~0.8时, IPTG诱导16 h(16℃, 150 r·min⁻¹)。诱导后的菌液超声裂解,分别收集上清液和沉淀,通过SDS-PAGE分析蛋白的表达,应用Ni NTA Beads纯化目的蛋白,随后进行Western blot鉴定。

1.6 间接酶联免疫吸附试验(ELISA)

1.6.1 间接ELISA检测方法的建立及阴阳临界值的判定 利用InlB蛋白作为包被抗原,采用棋盘法优化间接ELISA检测体系的反应条件。抗原包被液浓度(8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 μg·mL⁻¹), 4℃包被过夜。封闭条件(5%脱脂奶、10%脱脂奶、10% BSA), 37℃ 2 h, 血清稀释度(1:50、1:100、1:200、1:400、1:800), 二抗为HRP标记的羊抗小鼠IgG以1:2 500的稀释比37℃孵育1 h, TMB

表 1 引物序列
Table 1 Primers sequence

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence
<i>inlB</i> -F	catATGGAGCTCGGTACCCTCGAGGGATCCgtgaagaaaagcacaaccaagaagg
<i>inlB</i> -R	GCAGGTCGACAAGCTTGAATTCTtatttctgtgcccttaaattagctgctttcg
pCold-F	ACGCCATATCGCCGAAAGG
pCold-R	GGCAGGGATCTTAGATTCTG

(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)单组分显色时间(5、8、10 min)。加入终止液 50 μL,检测 450 nm 处的 OD 值,比较阳性孔(P)/阴性孔(N)值,判定最佳反应条件。

使用优化好的间接 ELISA 方法检测 20 份质控阴性血清,测定 OD_{450 nm} 值,利用统计学分析,当 OD_{450 nm} ≥ $\bar{x} + 3s$ 为阳性,当 OD_{450 nm} < $\bar{x} + 3s$ 为阴性, $\bar{x}$ 为平均值, s 为标准差^[12-15]。

1.6.2 特异性检测 利用优化后的间接 ELISA 检测方法对 LM 阳性血清、布鲁氏菌阳性血清、牛型结核分枝杆菌阳性血清、产气荚膜梭菌 ε 蛋白阳性血清和阴性血清进行检测,以阴性血清为阴性对照,评估该方法的特异性。

1.6.3 敏感性检测 对 LM 的阳性血清进行稀释(1:50、1:100、1:200、1:400、1:800),判定敏感性。

1.6.4 重复性检测 对本研究建立的方法进行批内、批间重复性试验。批内重复性检测为同一块酶标板上检测 3 份阳性血清和 3 份阴性血清。批间重复性检测为使用同一批次纯化的 InlB 蛋白,在不同日期的独立试验中检测相同的阴阳性血清。以上重复性检测试验重复 3 次,计算 $\bar{x} \pm s$ 以及批内及批间变异系数($CV = (\text{标准差} / \text{平均值}) \times 100\%$)^[16],评估重复性。

1.6.5 临床样品检测 应用本研究建立的间接 ELISA 方法,检测 24 份小鼠血清,并用商品化的单增李斯特菌 ELISA 试剂盒同时检测,计算二者符合率。符合率(%) = [(阳性符合总数 + 阴性符合总数) / 样品总数] × 100%^[13]。

1.7 统计学分析

采用 Excel(2023)进行数据统计分析,所有试验数据经过至少三次生物学重复,以平均值($\bar{x}$) ± 标准差(s)表示,通过变异系数及符合率评估方法的重复性和临床样本检测一致性。

2 结 果

2.1 重组蛋白的制备

以 LM 灭活菌液为 DNA 模板,应用 *inlB*-F 和 *inlB*-R 引物进行扩增,扩增出的片段长度为 1 893 bp,经测序未发现碱基突变,表明 pCold II -10×His-InlB 重组表达载体构建成功(图 1A)。

经 SDS-PAGE 电泳检测发现,上清和沉淀的样品中出现了约为 69 ku 的蛋白条带,大小与预期条带一致,即 InlB 蛋白成功可溶性表达(图 1B)。利用 Ni NTA beads 纯化目的蛋白并进行 Western blot 鉴定,结果所示,约在 69 ku 处有特异性条带(图 1C)。

2.2 间接 ELISA 反应条件优化

通过棋盘法进行试验,确定了最佳包被蛋白浓度为 4 μg·mL⁻¹,最佳封闭液为 10% 脱脂奶粉,血清最佳稀释度为 1:400,二抗最佳稀释度为 1:2 500,TMB 最佳显色时间为 37 °C 8 min。

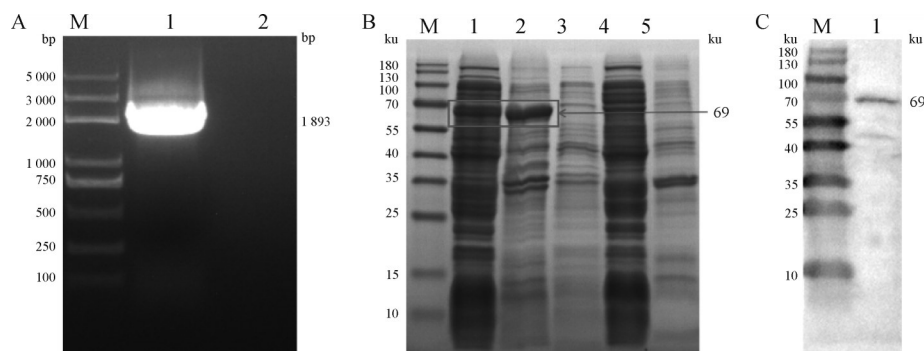
2.3 阴阳临界值的判定

以最适反应条件检测 20 份质控阴性样品,检测 OD_{450 nm} 结果显示,阴性血清 OD_{450 nm} 值处于 0.201~0.315,通过计算得出平均值($\bar{x}$)为 0.250 7,标准差(s)为 0.036 9, $\bar{x} + 3s$ 为 0.361。考虑到误差等因素,在确认结果可靠的前提下,当检测样本 OD_{450 nm} ≥ 0.37 时为阳性,当检测样本 OD_{450 nm} < 0.37 时为阴性。

结果显示,仅 LM 的血清为阳性,其他小鼠源阳性血清均为阴性,表明本研究建立的方法特异性较好。

2.4 敏感性检测

对阳性血清进行梯度稀释,结果显示,当血清稀释度为 1:800 时,其 OD_{450 nm} (0.405 ± 0.012) 仍为阳性,表明本研究建立的间接 ELISA 方法敏感性高。



A. *inlB* 基因扩增片段(M. 蛋白相对分子质量标准;1. *inlB* 基因扩增片段;2. 阴性对照);B. InlB 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析(M. 蛋白相对分子质量标准;1. InlB 诱导后上清;2. 诱导后 InlB 菌液沉淀;3. InlB 未诱导菌液;4. pCold II -10×His 空载体诱导后上清;5. pCold II -10×His 空载体诱导后沉淀);C. InlB 蛋白的 Western blot 鉴定(M. 蛋白相对分子质量标准;1. InlB 纯化后蛋白)

A. Amplified fragment of the *inlB* gene (M. Protein marker; 1. The *inlB* gene amplified fragment; 2. The negative control); B. SDS-PAGE analysis of the InlB expressed protein (M. Protein marker; 1. The supernatant after InlB induction; 2. The precipitation of InlB bacterial fluid after induction; 3. The InlB uninduced bacterial fluid; 4. The supernatant after induction of pCold II-10×His empty vector; 5. The precipitation after induction of pCold II-10×His empty vector); C. Western blot identification of the InlB protein (M. Protein marker; 1. Purified InlB protein)

图1 *inlB* 基因扩增与 InlB 蛋白表达及鉴定

Fig. 1 *inlB* gene amplification and InlB protein expression and identification

2.5 重复性检测

结果显示,本 ELISA 方法的批内重复变异系数为 2.79%~6.64%,批间重复的变异系数为 2.61%~7.75% [$CV=(\text{标准差}/\text{平均值})\times 100\%$],

本方法的批间变异系数(2.61%~7.75%)显著低于国际临床化学联合会(IFCC)推荐的 10% 阈值,表明该方法的重复性良好(表2)。

表2 重复性试验结果

Table 2 Repeatability test results

样品序号 Sample No.	批内变异系数/% Intra batch CV		批间变异系数/% Inter batch CV	
	平均数 $\bar{x}\pm s$	变异系数 CV	平均数 $\bar{x}\pm s$	变异系数 CV
1	1.239±0.063	5.08	1.303±0.034	2.61
2	1.217±0.034	2.79	1.256±0.047	3.74
3	1.268±0.044	3.47	1.237±0.060	4.85
4	0.287±0.018	6.23	0.299±0.016	5.35
5	0.294±0.009	3.06	0.302±0.019	6.29
6	0.301±0.020	6.64	0.284±0.022	7.75

2.6 样品检测

使用优化后的间接 ELISA 检测方法与商用试剂盒对 24 只小鼠的 LM 阳性血清样品进行检测。结果显示,阴性符合率为 83.33%(5/6),阳性符合率为 100%(18/18),总体符合率为 95.83%(23/24)。

3 讨论

InlB 蛋白是 LM 的关键毒力因子,通过受体 c-Met 侵袭各种宿主细胞,并在感染的后期协助菌株以囊泡形式逃逸^[17]。InlB 蛋白具有很好的免疫原性,应用 InlB 蛋白作为特异性抗原,从而增加本

研究的可靠性。因此,通过构建 pCold II -10×His-InlB 重组表达载体,经纯化鉴定后,对 ELISA 方法的各种条件筛选和优化,建立了 InlB 蛋白作为包被抗原的间接 ELISA 方法。本方法的特异性检测结果显示,InlB 蛋白仅与 LM 阳性血清反应,而对其他小鼠源阳性血清无交叉反应,表明 InlB 蛋白作为抗原具有特异性。敏感性检测结果显示,本方法检测效价达 1:800,较基于 LLO 合成肽的间接 ELISA (最高稀释度 1:200)^[18],本研究建立的间接 ELISA 方法敏感性提高了 4 倍。批内和批间重复性试验显示,变异系数均低于国际推荐的 10% 阈值,表明本方法具有稳定性和可重复性。临床样本检测中,与商品化试剂盒的总体符合率达到 95.83%,进一步验证了本方法的可靠性。尽管阴性符合率略低,但这一差异可能源于样本数量有限或商品化试剂盒的检测标准不同,后续可通过扩大样本量进一步优化。

在方法学比较方面,相较于传统培养法(检测通常需 3~7 d),本方法检测时间缩短至 1.5 d,效率显著提高^[19]。较双抗体夹心方法,间接 ELISA 的方法通用性更强,成本更低,信号放大能力更强,操作简单;与 PCR-ELISA 方法相比,间接 ELISA 污染风险较低,更为高效、经济。在后续研究中本研究团队会着重于收集临床样本血清,进一步确定符合率的范围。另外,团队也着重进一步优化抗原制备,以提高检测敏感性,有助于后续的开发与应用^[17,20-22]。

综上,本研究经过条件优化和筛选,体外成功可溶性表达 InlB 蛋白,并利用 InlB 蛋白作为包被抗原建立了检测 LM 感染样品的间接 ELISA 检测方法。本方法具有敏感性强、特异性好且重复性高的优点,为李斯特菌病的监测和诊断提供了参考。

4 结 论

本研究成功利用 pCold II -10×His 载体可溶性表达并纯化 InlB 蛋白,建立了一种检测产单核细胞李氏杆菌感染小鼠血清的间接 ELISA 方法。该方法蛋白包被浓度为 $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,10% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,酶标二抗最佳稀释度为 1:2 500,37℃ 避光显色 8 min,临界值为 0.37,特异性好,灵敏度高(血清稀释度 1:800),重复性佳($\text{CV}<10\%$),与商品化试剂盒符合率达 95.83%,可用于 LM 感染的快速检测与监测。

参考文献(References):

- [1] SRI VIGNA HEMA V, MANICKAVASAGAN A. Blockchain implementation for food safety in supply chain: A review[J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2024, 23(5): e70002.
- [2] DAS S, MALIK S V S, SHRIVASTAVA S, et al. Comparative efficacy of Internalin C-based peptide and listeriolysin O-based enzyme linked immunosorbent assays for serodiagnosis of listeric infection in goats[J]. *Afr J Microbiol Res*, 2013, 7(48): 5471-5478.
- [3] ETTY M C, D'AURIA S, FRASCHINI C, et al. Effect of the optimized selective enrichment medium on the expression of the p60 protein used as *Listeria monocytogenes* antigen in specific sandwich ELISA[J]. *Res Microbiol*, 2019, 170(4-5): 182-191.
- [4] D'ALEO F, TUSCANO A, SERVELLO T, et al. Relevance of microbiological cultures of cord blood and placental swabs in the rapid diagnosis of preterm newborn infection due to *Listeria monocytogenes*: A case report[J]. *Case Rep Women's Health*, 2024, 43: e00638-e00638.
- [5] 王华健, 张 宁, 杨 威, 等. 3 种食源性致病菌 TaqMan 多重荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(4): 1201-1209.
WANG H J, ZHANG N, YANG W, et al. Establishment of a multiplex TaqMan fluorescence quantitative PCR method for detection of three foodborne pathogens[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(4): 1201-1209. (in Chinese)
- [6] GLASER P, FRANGEUL L, BUCHRIESER C, et al. Comparative genomics of *Listeria species*[J]. *Science*, 2001, 294(5543): 849-852.
- [7] GAILLARD J L, BERCHE P, FREHEL C, et al. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci[J]. *Cell*, 1991, 65(7): 1127-1141.
- [8] DRAMSI S, DEHOUX P, LEBRUN M, et al. Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD[J]. *Infect Immun*, 1997, 65(5): 1615-1625.
- [9] YING F. A Review: the molecular mechanisms of inlA- and inlB- mediated Invasion of *Listeria monocytogenes* into host cell[J]. *Microbiology*, 2009. DOI:10.1016/S1003-6326(09)60084-4.
- [10] LIU D, BAI X, HELMICK H D B, et al. Cell-surface

- anchoring of *Listeria* adhesion protein on *L. monocytogenes* is fastened by internalin B for pathogenesis [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(5):112515.
- [11] YUAN Y Q, NING W Q, CHEN J, et al. Serine/threonine protein kinase mediates rifampicin resistance in *Brucella melitensis* through interacting with ribosomal protein RpsD and affecting antioxidant capacity [J]. *mSystems*, 2024, e0110924.
- [12] 邹 予, 吴东琪, 黎宏嘉, 等. 基于大片形吸虫 NAT13 蛋白的间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2025, 47(9):934-939.
- ZOU Y, WU D Q, LI H J, et al. Establishment of an indirect ELISA method for detecting NAT13 protein based on *Fasciola gigantica* [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2025, 47(9):934-939. (in Chinese)
- [13] 杨振宇, 李 璇, 刘一宁, 等. 猪肺炎支原体 P46-P65 重组蛋白的表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2024, 46(7):709-715.
- YANG Z Y, LI X, LIU Y N, et al. Expression of *Mycoplasma hyopneumoniae* P46-P65 recombinant protein and establishment of an indirect ELISA for antibody detection [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2024, 46(7):709-715. (in Chinese)
- [14] 裴艳艳, 张梦琳, 许 浒, 等. 猪胞内劳森菌抗体间接 ELISA 检测方法的建立及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2024, 46(1):55-60.
- PEI Y Y, ZHANG M L, XU H, et al. Development and application of an indirect ELISA for detection of antibody for porcine *Lawsonia intracellularis* [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2024, 46(01):55-60. (in Chinese)
- [15] 陈瑞红, 林 俊, 杨立新, 等. 牛病毒性腹泻病毒重组 p80 蛋白的间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42(3):252-257.
- CHEN R H, LIN J, YANG L X, et al. An indirect ELISA for detection of antibody against bovine viral diarrhea virus using recombinant p80 protein expressed in *E. coli* [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 42(3):252-257. (in Chinese)
- [16] 肖 琨, 王永璇, 田 芬, 等. 基于山羊痘病毒融合蛋白的间接 ELISA 检测方法的建立及初步应用[J/OL]. 中国动物传染病学报, 1-8. [2025-12-22]. <https://doi.org/10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20250127.002>.
- XIAO K, WANG Y X, TIAN F, et al. Establishment and preliminary application of an indirect ELISA method for goatpox virus fusion protein [J/OL]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 1-8. [2025-12-22]. <https://doi.org/10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20250127.002>. (in Chinese)
- [17] CAIN R J, SCORTTI M, MONZÓ H J, et al. *Listeria* inlB expedites vacuole escape and intracellular proliferation by promoting Rab7 recruitment via Vps34 [J]. *mBio*, 2023, 14(1):e0322122.
- [18] BAETZ A L, WESLEY I V, STEVENS M G. The use of listeriolysin O in an ELISA, a skin test and a lymphocyte blastogenesis assay on sheep experimentally infected with *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* or *Listeria innocua* [J]. *Vet Microbiol*, 1996, 51(1-2):151-159.
- [19] MAGALHÃES R, MENA C, FERREIRA V, et al. Traditional methods of analysis for *Listeria monocytogenes* [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2220:3-16.
- [20] 王 燕, 邹艳丽, 何佳依, 等. 非洲猪瘟病毒 pK205R 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2025, 57(2):105-11.
- WANG Y, ZOU Y L, HE J Y, et al. Establishment of an indirect ELISA antibody detection method based on African swine fever virus pK205R protein [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2025, 57(2):105-11. (in Chinese)
- [21] 李建铭, 侯晋辉, 徐广鑫, 等. 高效区分胸膜肺炎放线杆菌自然感染和疫苗免疫猪的 ELISA 检测方法构建[J]. 河南农业大学学报, 2025, 59(6):1028-1036.
- LI J M, HOU J H, XU G X, et al. Establishment of ELISA assay to efficiently distinguish natural infection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from vaccine-immunized pigs [J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2025, 59(6):1028-1036. (in Chinese)
- [22] 宋莎莎, 王洪利, 朱 光, 等. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白多克隆抗体的制备及抗体 ELISA 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2025, 57(2):84-90.
- SONG S S, WANG H L, ZHU G, et al. Preparation of duck Tembusu virus E protein polyclonal antibodies and establishment of an antibody ELISA detection method [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2025, 57(2):84-90. (in Chinese)

(编辑 白永平)