



Dosage de la lactoferrine bovine par les techniques immunoenzymatiques (ELISA)

C. Le Magnen, P. Rainard, J.L. Maubois, A. Paraf, L. Phan Thanh

► To cite this version:

C. Le Magnen, P. Rainard, J.L. Maubois, A. Paraf, L. Phan Thanh. Dosage de la lactoferrine bovine par les techniques immunoenzymatiques (ELISA). *Le Lait*, 1989, 69 (1), pp.23-32. <hal-00929146>

HAL Id: hal-00929146

<https://hal.science/hal-00929146v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Article de recherche

Dosage de la lactoferrine bovine par les techniques immunoenzymatiques (ELISA)

C. Le Magnen¹, P. Rainard², J.L. Maubois¹, A. Paraf³
et L. Phan Thanh³

¹ INRA, Laboratoire de recherches de technologie laitière, 65, rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex, France

² INRA, Station de pathologie de la reproduction, Nouzilly, 37380 Monnaie, France

³ INRA, Laboratoire d'immunologie, Nouzilly, 37380 Monnaie, France

(reçu le 10-9-1987, accepté le 23-6-1988)

Résumé — Une lactoferrine commerciale et 2 préparations purifiées au laboratoire par chromatographie ont été analysées par PAGE, de manière à utiliser la plus pure pour immuniser des lapins. On a obtenu des anticorps spécifiques de la lactoferrine, contaminés par une petite quantité d'anticorps dirigés contre la lactoperoxydase : en diluant le sérum au 1/5 000^e, on obtient un réactif spécifique de la lactoferrine. On a pu alors par différentes techniques ELISA déterminer une courbe d'étalonnage utilisable pour mesurer les quantités de lactoferrine présentes dans le lait avec une sensibilité atteignant 1 ng/ml.

lactoferrine bovine – ELISA

Summary — **Enzyme linked immunosorbent assay for bovine lactoferrin titration.** *Different preparations of bovine lactoferrin either commercially available or purified in our laboratory were analysed by SDS-PAGE for purity. Rabbits were immunized with the most purified lactoferrin which induced high yield of specific antisera slightly contaminated by anti-lactoperoxydase antibodies. By using dilutions higher than 1/5 000^e, such antisera could be considered as specific for lactoferrin. ELISA tests, were designed which allowed a quantitative assay of bovine lactoferrin in milk or milk products down to 1 ng/ml.*

bovine lactoferrin – ELISA

Introduction

La lactoferrine est une protéine de masse moléculaire 78 000 D (Castellino *et al.*, 1970) présente dans le lait, ainsi que dans de nombreux tissus et leurs excré-

Sa purification présente certaines difficultés, tenant au fait que la lactoferrine adhère fortement aux gels normalement utilisés dans les techniques de chromatographie. Différentes équipes ont cependant réussi à purifier cette protéine à partir de lactosérum par chromatographie sur

résines échangeuses d'ions (Johansson, 1960; Groves, 1960; Oram et Reiter, 1968; Smith *et al.*, 1971; Law et Reiter, 1977; Zagulski *et al.*, 1979) ou plus récemment par chromatographie d'affinité au cuivre (Lonnerdal *et al.*, 1977), sur héparine sépharose (Blackberg et Hernell, 1980; Rainard *et al.*, 1982) ou avec un anticorps monoclonal (Kawakami *et al.*, 1985).

La concentration de lactoferrine varie, selon la période de lactation, de 0,02 à 0,35 mg/ml dans le lait de vache (Senft *et al.*, 1976; Smith et Schanbacher, 1977; Multigner *et al.*, 1981; Nonnecke et Larry-Smith, 1984a), de 0,02 à 1,89 mg/ml dans un lait de mammite (Gaunt *et al.*, 1980) et de 1 à 5 mg/ml dans le colostrum (Gaunt *et al.*, 1980; Nonnecke et Larry-Smith, 1984b)).

Différentes méthodes immunologiques ont été employées pour le dosage de la lactoferrine, notamment l'immunodiffusion radiale en gel d'agarose (Mancini *et al.*, 1985; Masson et Heremans, 1971; Multigner *et al.*, 1981) et l'électro-immunodiffusion (Laurell, 1966; Nagazawa *et al.*, 1972, 1973; Schanbacher et Smith, 1974; Harmon, 1980). Ces techniques présentent une faible sensibilité, de l'ordre de 2 mg/l (Multigner *et al.*, 1981) et 500 mg/l (Nagazawa *et al.*, 1972) respectivement. Elles sont, en outre, trop longues et nécessitent d'importantes quantités d'anti-sérum. Pour toutes ces raisons, elles tendent donc à être remplacées par la technique immuno-enzymatique (ELISA) qui s'adapte bien aux microméthodes et qui est beaucoup plus sensible.

Plusieurs publications relatent l'utilisation de cette technique pour le dosage de la lactoferrine humaine dans le lait, le sérum ou d'autres liquides biologiques (Estevenon et Figarella, 1983; Bezwoda *et al.*, 1985; Chung *et al.*, 1985). La sensibilisation du test est de 1 à 10 µg/l.

Dans cet article, nous décrivons des techniques ELISA adaptées à la lactoferrine bovine. Elles permettent un dosage spécifique et très sensible de cette protéine dans le lait bovin et ses dérivés.

Matériels et Méthodes

Lactoferrine

La pureté de différents échantillons de lactoferrine bovine a été testée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS :

- lactoferrine commerciale Serva : L₁;
- lactoferrine purifiée dans notre laboratoire par chromatographie d'échange d'ions : L₂;
- lactoferrine purifiée par chromatographie sur héparine-sépharose et gel filtration : L₃ (Rainard *et al.*, 1982).

Immunisation

L'anticorps antilactoferrine est produit par le lapin. Le protocole d'immunisation est le suivant :

– 1^{re} injection : 500 µg de lactoferrine L₃ homogénéisée dans 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund sont injectés par voie intradermique à chaque lapin;

– 2^e et 3^e injections : analogues à la précédente avec adjuvant incomplet de Freund, elles sont pratiquées à J15 et J35.

Les injections de rappel sont réalisées ensuite une fois par mois à raison de 100 µg dans 100 µl de PBS par voie intraveineuse.

Les prélèvements de sang sont faits tous les 5 jours à partir de la 2^e injection à raison de 3 prélèvements après chaque immunisation et poursuivis jusqu'à la chute du titre de l'anticorps.

Techniques de dosage immunoenzymatique (ELISA)

Elles sont basées sur la technique d'Engvall et Perlmann (1971) avec des modifications.

Technique ELISA directe

Tous les réactifs sont utilisés sous le volume de 200 µl. Les essais se font en doublets.

Les plaques de microtitration Immuno Nunc (Polylabo) sont sensibilisées avec des quanti-

tés de lactoferrine variables (0,75 à 100 µg/l) diluées dans du tampon carbonate-bicarbonate 0,05 M, pH 9,6 pendant 1 à 2 h à 37°C ou une nuit à 4°C.

Les plaques sont alors vidées et saturées avec une solution de gélatine 1% dans du tampon carbonate-bicarbonate pendant 1 h à 37°C.

Après rinçage 5 fois au tampon phosphate salin 0,01 M phosphate 0,15 M NaCl ; 0,05% Tween 20 (PBS-Tween), l'anticorps antilactoferrine est ajouté à une dilution convenable et incubé pendant 1 h à 37°C (ou une nuit à 4°C) avec légère agitation.

Après rinçage comme précédemment, l'anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de lapin conjugué à la peroxydase (Biorad/Touzart Matignon) est ajouté à la dilution de 1/3 000^e en PBS-Tween et incubé pendant 1 h à 37°C.

Après rinçage comme plus haut, on ajoute le substrat ABTS (2,2'-azino-di 3-éthyl-benz-thiazoline sulfonate) de Boeringher-Mannheim, utilisé à 0,1 mg/ml contenant 0,1% d'H₂O₂. Son oxydation doit se développer pendant 15 à 30 min avec apparition d'une couleur verte. La réaction est arrêtée avec du sodium-dodécyl-sulfate (SDS) à 10% (20 µl pour 200 µl de volume de réaction). La lecture de la densité optique à 405 nm se fait par lecteur Biotek EL 307.

Technique ELISA par compétition

Dans des tubes Eppendorf, une même quantité d'antisérum (200 µl à la dilution 1/25 000^e) est incubée avec 200 µl de solution contenant des quantités variables de lactoferrine pendant une nuit à 4°C. 150 µl de chacun de ces mélanges sont ensuite transférés en doublets sur une plaque de microtitration qui a été préalablement sensibilisée avec de la lactoferrine (1-2 µg/ml), et saturée de gélatine 1%, comme plus haut (étapes 1 et 2). Après incubation d'une heure à 37°C, on procède comme plus haut (étapes 4 et 5).

Electrophorèse

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS se fait d'après Laemmli (1970).

La révélation des bandes de protéine séparées sur le gel se fait par la technique de coloration au nitrate d'argent de Heukeshoven et Dernick (1985).

Immunoélectrophorèse

L'immunoélectrophorèse se fait d'après la technique décrite par Axelsen *et al.* (1973).

Résultats et discussion

Sélection de l'antigène

La Figure 1 montre les résultats de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide et en présence de SDS de différents échantillons de lactoferrine.

La coloration au bleu de Coomassie ne révélant que les bandes majeures, nous lui avons préféré la coloration au nitrate d'argent dont la très haute sensibilité permet de détecter la présence d'éventuels contaminants.

Parmi nos échantillons, la lactoferrine L₃ purifiée par chromatographie d'affinité sur héparine sépharose et filtration sur gel (Rainard *et al.*, 1982) est celle qui présente le moins de contaminants. Elle a donc été choisie pour l'immunisation des lapins.

La détermination de la concentration *c* en protéines des solutions de lactoferrine se fait par la mesure de l'absorption *A* à 280 nm et par le calcul à l'aide de la formule

$$C = \frac{A_{280}}{\epsilon}$$

où $\epsilon = 1,45$ et $A = 280/\text{mg/ml}$.

Production d'anticorps antilactoferrine

Sur 2 lapins immunisés, l'un produit un sérum qui devient positif dès la 2^e injection. Une 3^e injection est nécessaire chez le 2^e lapin pour qu'il produise un anticorps de haut titre. Le titre des sérums est mesuré par ELISA en se plaçant en excès d'antigène (lactoferrine 1 µg/ml). Les densités optiques obtenues pour une gamme de dilutions du sérum à titrer allant du 1/500^e au 1/160 000^e sont comparées à

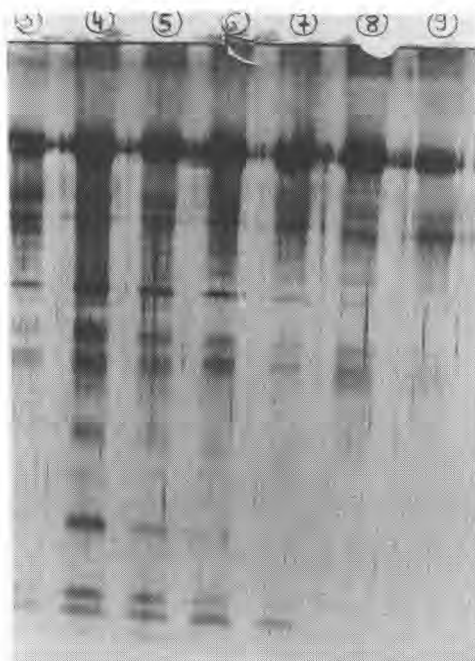


Fig. 1. Comparaison de 3 lots de lactoferrine par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et coloration à l'argent. Dépôts. 4) L_1 : 2 μ g; 5) L_1 : 1 μ g; 6) L_2 : 2 μ g; 7) L_2 : 1 μ g; 8) L_3 : 2 μ g; 9) L_3 : 1 μ g.

celles correspondant aux mêmes dilutions d'un antisérum positif spécifique de la LF et qui a été pris comme référence (Rainard *et al.*, 1982). Les résultats figurent dans le Tableau I.

Les 2 lapins produisent un sérum ayant un titre équivalent au sérum positif de référence, l'un à partir de J30, l'autre à partir de J50. Les titres commencent à baisser dans les 3 semaines suivant l'injection de rappel.

Spécificité des anticorps

La spécificité du sérum a été vérifiée par immunoélectrophorèse (résultats non

présentés). En outre, sachant que la principale protéine pouvant contaminer l'échantillon de lactoferrine utilisé pour l'immunisation est la lactoperoxydase (Zagulski *et al.*, 1979; Daniel-Audran, 1980), l'absence d'anticorps antilacto-peroxydase dans les sérums est testée par ELISA. Une série de puits de la plaque de microtitration sont donc sensibilisés avec de la lactoferrine à 1 μ g/ml, une autre série avec la lactoperoxydase (Boehringer) à la même concentration.

Une gamme de dilutions du sérum allant du 1/500^e au 1/160 000^e est ensuite ajoutée aux 2 séries. Les résultats de densités optiques figurent dans le Tableau II.

La densité optique obtenue avec l'antigène lactoperoxydase est beaucoup plus faible que celle obtenue avec l'antigène lactoferrine pour la même dilution de l'antisérum utilisé, et on peut dire que l'antisérum est spécifique de la lactoferrine à partir de la dilution au 1/5 000^e.

Ce résultat permet de conclure que les anticorps antilacto-peroxydase sont en quantité trop faible pour interférer dans le dosage avec l'antisérum dilué au 1/5 000^e.

Détermination des conditions optimales de titrage dans la technique ELISA directe. Courbe d'étalonnage

En faisant varier, sur une même plaque de microtitration, les quantités d'antigène (de 0,5 à 1 000 ng/ml) et les quantités d'anticorps (dilution du sérum de 1/100^e au 1/40 000^e), il est possible de déterminer la concentration optimale d'anticorps à utiliser pour une gamme de concentrations d'antigène donnée.

Il s'agit de la combinaison de dilutions d'antigène et d'antisérum qui donne la séparation maximale entre les échantillons négatifs et positifs mais qui donne

Tableau I. Titre des antisérums antilactoferrine.

<i>Dilution du sérum</i>	<i>Sérum positif de référence</i>	<i>Sérum lapin 1 (J30)</i>	<i>Sérum lapin 2 (J50)</i>
1/500 ^e	1,855	1,977	1,870
1/5 000 ^e	1,727	1,762	1,700
1/10 000 ^e	1,666	1,683	1,630
1/20 000 ^e	1,579	1,569	1,540
1/40 000 ^e	1,434	1,429	1,490
1/80 000 ^e	1,270	1,352	1,241
1/160 000 ^e	0,990	1,107	1,068
AC négatif (1/1 000 ^e)	0200	0,180	0,160

Tableau II. Spécificité de l'antisérum antilactoferrine.

<i>Dilution du sérum</i>	<i>Antigène : lactoferrine</i>	<i>Antigène : lactoperoxydase</i>
1/500 ^e	1,403	0,452
1/5 000 ^e	1,383	0,150
1/10 000 ^e	1,320	0,109
1/20 000 ^e	1,184	0,089
1/40 000 ^e	1,009	0,079
1/80 000 ^e	0,764	0,068
1/160 000 ^e	0,470	0,064
AC négatif (1/1 000 ^e)	0,165	0,130

encore des basses valeurs négatives (au-dessus de 0,2).

Ces conditions sont réalisées pour une dilution de sérum à partir de 1/1 000^e dans une gamme de concentration d'antigène de 0,5 à 250 ng/ml.

La variation de la densité optique en fonction de la concentration d'antigène est représentée sur la Figure 2. La relation est linéaire entre 2,5 et 100 ng/ml. Cette courbe d'étalonnage peut servir à doser des solutions inconnues de lactoferrine bovine. La sensibilité du dosage, définie comme la plus petite concentration d'anti-

gène donnant une densité optique significativement différente de celle du témoin blanc, est de 1 ng/ml. Ces chiffres sont en accord avec ceux obtenus pour le dosage de la lactoferrine humaine (Daniel-Audran, 1980; Bezwoda *et al.*, 1985).

Dosage ELISA par compétition

Lorsque la lactoferrine se trouve dans un milieu complexe comme dans le cas du lait, la technique ELISA directe ne peut être utilisée car les autres protéines majeures (en particulier les caséines) se

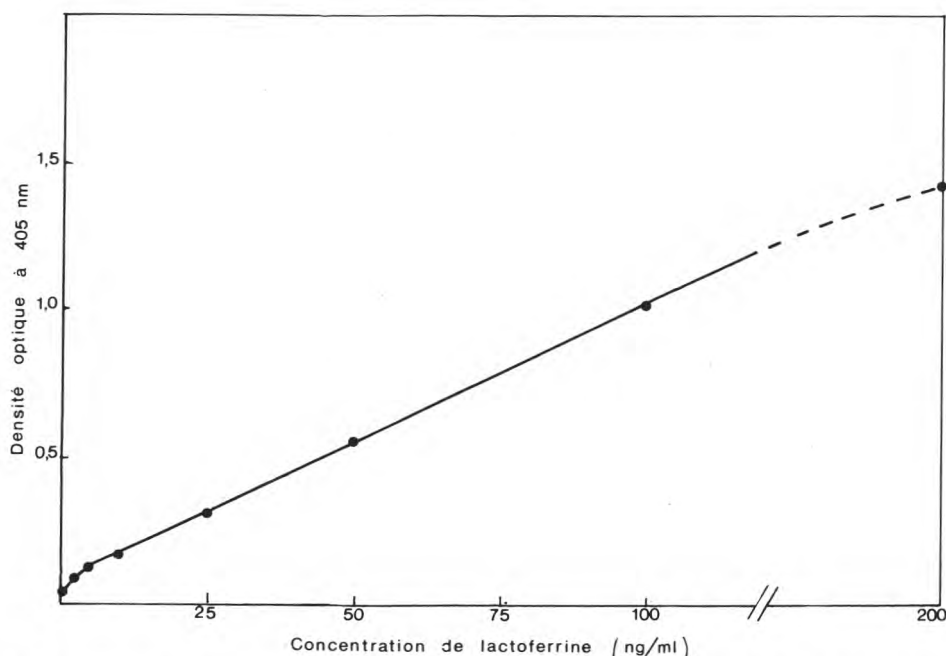


Fig. 2. Courbe d'étalonnage : variation de la densité optique à 405 nm en ELISA direct en fonction de la concentration en lactoferrine en utilisant le sérum du lapin 1 dilué au 1/5 000^e.

fixent en quantité importante sur le plastique et faussent les résultats. Il est alors nécessaire de recourir à la technique ELISA par compétition, qui consiste à doser la quantité d'antisérum resté libre après réaction avec des quantités variables d'antigène.

Un essai préalable est effectué avec une large gamme de concentrations de LF et la courbe représentant $\Delta DO = f(\text{Log}(\text{LF}))$ obtenue est une sigmoïde (Tableau III et Fig. 3). Une droite d'étalonnage est dressée dans la partie linéaire de la courbe qui correspond à une gamme de concentrations de LF comprises entre 30 et 100 ng/ml (Tableau IV et Fig. 4). Un lait écrémé du commerce a

été dosé dans ces conditions. La densité optique obtenue pour cet échantillon au 1/1 000^e correspond à une concentration de LF de 37 ng/ml. D'après la courbe d'étalonnage, la teneur en LF de ce lait écrémé est donc de 37 µg/ml. On remarque que, dans les 2 techniques ELISA, directe et par compétition, les gammes de concentration de LF qui correspondent à la partie linéaire de la droite d'étalonnage sont équivalentes (de 10 à 100 ng/ml).

L'antisérum est utilisé très dilué dans la technique par compétition (1/25 000^e) et on pourrait diluer davantage l'antisérum en ELISA direct, ce qui permettrait de diminuer le bruit de fond ainsi que le coût de l'analyse.

Tableau III. Variation de la densité optique en fonction de la concentration en lactoferrine.

LF ng/ml	0	10	30	100	300	900	3 000
Log LF	-∞	1	1,48	2	2,48	2,95	3,48
OD	1,091	0,985	0,779	0,510	0,310	0,215	0,186
ΔOD	0	0,106	0,212	0,581	0,781	0,876	0,905

ΔOD : Différence de densité optique du mélange sans antigène et du mélange avec antigène LF. Conditions expérimentales : 200 µl d'antisérum au 1/25 000^e et 200 µl des solutions de LF allant de 0 à 3 µg/ml par intervalles logarithmiques réguliers sont incubés une nuit à 4°C. 150 µl de chaque mélange sont mis, en doublet, sur la plaque préalablement sensibilisée à 2 µg/ml de LF. La réaction de l'enzyme peroxidase avec le substrat est arrêtée après 30 min. La DO d'un témoin de sérum négatif est de 0,020.

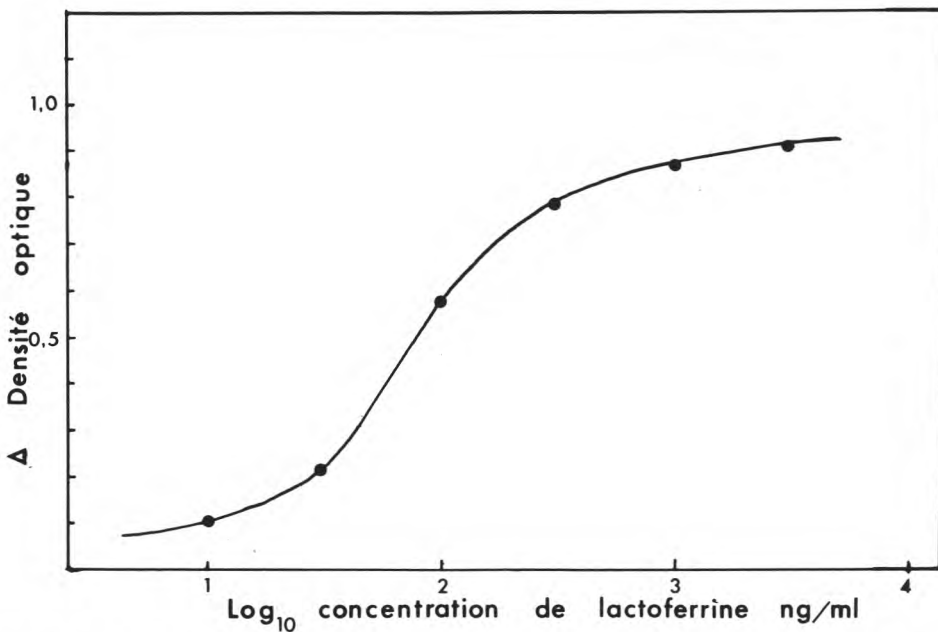


Fig. 3. Représentation de la densité optique (différentielle) en fonction du logarithme des quantités de lactoferrine dans la technique ELISA par compétition.

Conclusion

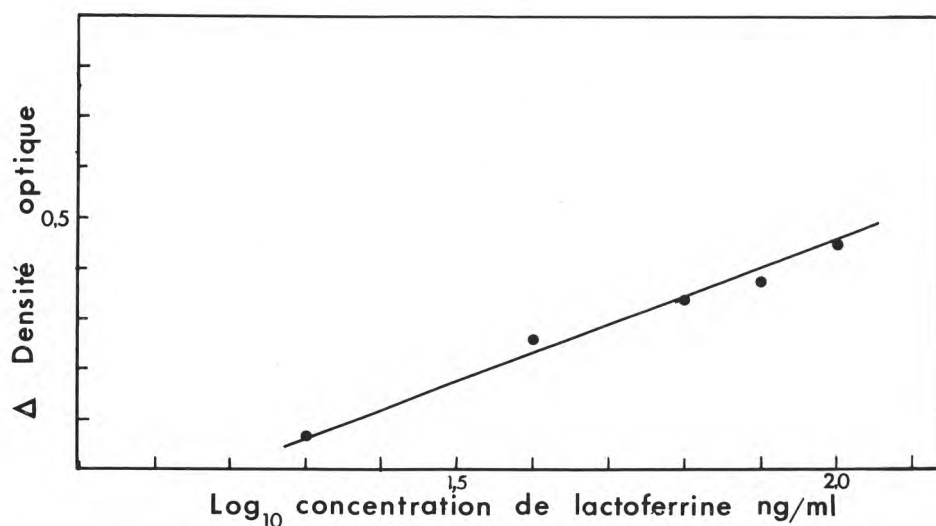
Les techniques de dosage de la lactoferrine par ELISA présentent de nombreux avantages par rapport aux techniques immunologiques classiques (immunodiffu-

sion radiale, immunoélectrophorèse) et aux techniques radio-immunologiques.

Commodité. Elles évitent les coulages de gels et les étapes longues de coloration, décoloration ainsi que le marquage radioactif. Elles ne nécessitent aucun

Tableau IV. Evolution de la densité optique en fonction de la concentration en lactoferrine.

LF en ng/ml	0	20	40	60	80	100	Lait 1/10 ⁴	Lait 1/10 ³
Log LF	-∞	1,3	1,6	1,78	1,9	2	1,57	2,12
OD	1,540	1,470	1,280	1,200	1,168	1,087	1,316	1,005
ΔOD	0	0,070	0,260	0,340	0,372	0,453	0,224	0,535

**Fig. 4.** Courbe d'étalonnage $\Delta DO = f(\log(LF))$ dans la technique ELISA par compétition.

matériel particulier hormis un lecteur ELISA et des équipements automatiques de pipettage et de lavage, dont la plupart des laboratoires d'analyses biochimiques sont déjà équipés.

Précision et sensibilité. La sensibilité des techniques ELISA est 100 à 1 000 fois supérieure à celle des techniques immunologiques classiques. Elle atteint 1 ng/ml et est donc du même ordre

que celle des méthodes radio-immunologiques. Cependant, ces dernières nécessitent la manipulation de radioéléments, donc des équipements et du personnel spécialisés.

Rapidité. Le dosage par ELISA directe peut être effectué normalement en 5 h. Le temps d'incubation anticorps-antigène pourrait encore être ramené à 30 min au lieu d'une heure.

Le dosage ELISA par compétition nécessite une incubation anticorps antigène supplémentaire qu'il est commode de faire la nuit précédant le dosage.

De nombreux échantillons peuvent être dosés en même temps (96 puits par plaque), ce qui constitue un gain de temps appréciable.

Les techniques ELISA sont donc des techniques de choix pour le dosage de la lactoferrine bovine dans les produits laitiers ou tout autre liquide biologique. Selon l'importance des protéines accompagnant la lactoferrine, on utilise la méthode directe ou celle par compétition. Les autres protéines présentes n'interfèrent pas dans le dosage tant que l'anti-sérum utilisé est spécifique de la lactoferrine.

Références

- Axelsen N.H., Kroll J. & Wecke B. (1973) Quantitative immunoelectrophoresis. *Scand. J. Immunol.* 2, 15-35
- Bezwoja W.R., Baynes R.D., Khan Q. & Mansoor N. (1985) Enzyme linked immuno-sorbent assay for lactoferrin. Plasma and tissue measurements. *Clin. Chim. Acta* 151, 61-69
- Blackberg L. & Hernell O. (1980) Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step. *FEBS Lett.* 109, 180-183
- Castellino J.F., Fish W.W. & Mann K.G. (1970) Structural studies on bovine lactoferrin. *J. Biol. Chem.* 245, 4269-4275
- Chung S., Hayward C., Brock D.J.H. & Van Heyningen V. (1985) A monoclonal antibody based immunoassay for human lactoferrin. *J. Immunol. Methods* 84, 135-141
- Daniel-Audran N. (1980) *Isolement de la lactoferrine et des immunoglobulines IgG bovines et étude in vivo et in vitro de leur activité bactériostatique*. Thèse, Paris VII
- Estevenon J.P. & Figarella C. (1983) A non competitive enzyme immunoassay of human lactoferrin in biological fluids. *Clin. Chim. Acta* 129, 311-318
- Engvall E. & Perlmann P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulins G. *Immunochemistry* 8, 871-874
- Gaunt S.N., Raffio N., Kingsbury E.T., Damon R.A., Johnson W.H. & Mitchell B.A. (1980) Variation of lactoferrin and mastitis and their heritabilities. *J. Dairy Sci.* 63, 1974-1979
- Groves M.L. (1960) The isolation of a red protein from milk. *J. Am. Chem. Soc.* 82, 3345-3352
- Harmon R.J. (1980) Neutrophil leucocyte as a source of lactoferrin in bovine milk. *Am. J. Vet. Res.* 41, 1603-1606
- Heukeshoven J. & Dernick R. (1985) Simplified methods for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103-112
- Johansson B. (1960) Isolation of an iron containing red protein from human milk. *Acta Chem. Scand.* 14, 510-512
- Kawakami H., Shinmoto H., Dosako S. & Ahiko K. (1985) Procédé de séparation de la lactoferrine bovine du lait de vache et sa purification. Brevet japonais n° 85 18779
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Laurell C.B. (1966) Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* 15, 45-49
- Law B.A. & Reiter B. (1977) The isolation and bacteriostatic properties of lactoferrin from bovine milk whey. *J. Dairy Res.* 44, 595-599
- Lonnerdal B., Carlsson J. & Porath J. (1977) Isolation of lactoferrin from human milk by metal chelate affinity chromatography. *FEBS Lett.* 75, 89-92
- Mancini G., Carbonara A. O. & Heremans J.F. (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2, 235-254
- Masson P.L. & Heremans J.F. (1971) Lactoferrin in milk from different species. *Comp. Biochem. Physiol.* 39B, 119-129
- Multigner L., Figarella C. & Sarles H. (1981) Diagnosis of chronic pancreatitis by measurement of lactoferrin in duodenal juice. *Gut* 22, 350-354
- Nagazawa T., Kiyosawa I. & Kuwahara K. (1972) Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. *J. Dairy Sci.* 55, 1651-1659
- Nagazawa T., Kiyosawa I. & Takase M. (1973) Lactoferrin and serum albumin of human

- casein in colostrum and milk. *J. Dairy Sci.* 57, 1159-1163
- Nonnecke J.B. & Larry-Smith K. (1984a) Inhibition of mastitic bacteria by bovine milk apolactoferrin evaluated by a microassay of bacterial growth. *J. Dairy Sci.* 67, 606-613
- Nonnecke J.B. & Larry-Smith K. (1984b) Biochemical and antibacterial properties of bovine mammary secretion during involution and at parturition. *J. Dairy Sci.* 67, 2863-2872
- Oram J.D. & Reiter B. (1968) Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron chelating agents. *Biochim. Biophys. Acta* 170, 351-365
- Rainard P., Poutrel B. & Caffin J.P. (1982) Lactoferrin and transferrin in bovine milk in relation to certain physiological and pathological factors. *Ann. Rech. Vet.* 13, 321-328
- Schanbacher F.L. & Smith K.L. (1974) Electroimmunodiffusion on cellulose acetate. A rapid method for analysis of bovine lactoferrin in chromatography effluents. *Anal. Biochem.* 59, 235-247
- Senft B., Klobasa H., Meyer F. & Pleiderer V.E. (1976) Untersuchungen über lactoferrin und immunoglobulin G in der kuhmilch. Variabilität in der konzentration während der laktation. *Suchtkun* 48, 278-288
- Smith K.L., Conrad H.R. & Porter R.M. (1971) Lactoferrin and IgG immunoglobulins from involuted bovine mammary glands. *J. Dairy Sci.* 54, 1427-1435
- Smith K.L. & Schanbacher F.L. (1977) Lactoferrin as a factor of resistance to infection of the bovine mammary gland. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170, 1224-1230
- Zagulski T., Jarzabek Z., Zagulska A. & Jedra M. (1979) A simple method of obtaining large quantities of bovine lactoferrin. *Pr. Mater. Zootech.* 20, 87-102