

# 家兔抗长角血蜱免疫模型的建立及对长角血蜱成蜱生长发育的影响

谢俊仁<sup>1</sup>, 刘光远<sup>1\*</sup>, 田占成<sup>1</sup>, 李知新<sup>1</sup>, 贾 宁<sup>2</sup>

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室  
甘肃省动物寄生虫病重点实验室 兰州 730046; 2. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

**摘要:** 每隔 2 周用长角血蜱成蜱定量感染家兔, 成功构建了具有不同抵抗力的家兔免疫模型。ELISA 检测结果表明, 家兔血清中的抗体效价从初次叮咬后第 3 周开始呈阳性, 随着叮咬次数的增加抗体水平逐渐上升, 第 11 周时达到高峰。具有一定抵抗力的家兔对长角血蜱成蜱的吸血和生长发育影响显著, 其抗体水平与长角血蜱成蜱在兔体的吸血周期、死亡率成正相关, 与雌蜱的饱血脱落率、饱血体重成负相关。结果进一步证明, 蜱的唾液腺是其主要的免疫器官之一。家兔抗体水平的持续期足以使长角血蜱完成一个世代, 可以满足试验需求, 是抗蜱免疫研究理想的阳性对照模型。同时, 血清中特异性抗体的效价也可以作为判断动物对长角血蜱抵抗力强弱的重要指标之一。

**关键词:** 长角血蜱; 成蜱; 免疫模型; 生长发育

中图分类号: S855.9; S852.74<sup>+</sup>6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)01-0079-06

## Construction of Rabbit Immunity Model Against *Haemaphysalis longicornis* and Its Effects on *H. longicornis* Adult Growth

XIE Jun-ren<sup>1</sup>, LIU Guang-yuan<sup>1\*</sup>, TIAN Zhan-cheng<sup>1</sup>, LI Zhi-xin<sup>1</sup>, JIA Ning<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China; 2. Faculty of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** In this study the rabbit immunity model against *Haemaphysalis longicornis* was constructed by infestation with *H. longicornis* adult quantitatively every two weeks. The results of ELISA showed that the antibody was positive three weeks post the first infection, the antibody level rising with the increasing of infection and reached the peak at the 11<sup>th</sup> week. The resistance of rabbit against *H. longicornis* significantly influenced the *H. longicornis* plump-blooding period. The antibody level was positively correlated to the bloodsucking period and the mortality of female *H. longicornis* adult and negatively correlated to the weight of plump-blooding female adult. These results indicated that the salivary gland is one of the main organs in the anti-*H. longicornis* immunity. The maintenance of the antibody level was long enough to make *H. longicornis* to complete a generation, which satisfied the experiment requirement. So it is an ideal

收稿日期: 2007-01-29

基金项目: 国家基础平台项目(2005DKA21205-3); 国家高新技术研究发展计划(863)项目(2006AA10A207); 甘肃省自然科学基金项目(3ZS041-A25-035)

作者简介: 谢俊仁(1975-), 男, 甘肃民勤人, 实习研究员, 硕士, 主要从事分子寄生虫学与免疫学研究, Tel: 0931-8342681, E-mail: xiejunren@126.com

\* 通讯作者: 刘光远, 男, 副研究员, 博士, 主要从事分子寄生虫学与免疫学研究, Tel: 0931-8311181, Fax: 0931-8340977, E-mail: liuguangyuan2002@sina.com

model for anti-*H. longicornis* immunity positive control research. At the same time, the specific antibody level in the serum can be one of the important indexes to evaluate the extent of animal resistance to *H. longicornis*.

**Key words:** *Haemaphysalis longicornis*; adult; immunity model; growth

长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)是一种在体表阶段性寄生的外寄生虫,发育过程可分为卵、幼蜱、若蜱和成蜱4个阶段,在我国分布较广,其宿主种类广泛,包括牛、马、羊等家畜和鹿、熊、狐、兔等野生动物,不仅自身作为病原体侵袭动物及人,还可以作为媒介传播多种病原(特别是血液原虫)<sup>[1-3]</sup>。目前,虽然有许多关于蜱螨引起的细胞免疫方面的报道,而从体液免疫角度研究的报道并不多。本研究在实验条件下,通过用长角血蜱成蜱多次定量定期地攻击家兔,使家兔产生一定的抵抗力,用ELISA检测家兔的抗体水平,构建不同抵抗力水平的活体模型,观察和统计在该模型上培养长角血蜱成蜱的各种相关指数,通过分析数据差异,探讨家兔的抵抗力对长角血蜱成蜱吸血及其生长发育的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验用蜱 长角血蜱来自中国农业科学院兰州兽医研究所,为在实验室内连续多代培育的单克隆株,取饱血若蜱在室温蜕皮后5~15 d清洁的饥饿成蜱。

1.1.2 绵羊 由兰州兽医研究所寄生虫虫种资源课题组培育,选未受过任何蜱种侵袭的青年绵羊2只,体重约30 kg。

1.1.3 家兔 健康的青紫蓝家兔,清洁级,体重2.4 kg,购于兰州生物制品研究所兔场,21只。

### 1.2 试验方法

1.2.1 唾液腺裂解蛋白的制备 在绵羊体内培养半饱血的长角血蜱成蜱,解剖并收集半饱血成蜱的唾液腺,经超声裂解后制备长角血蜱唾液腺裂解蛋白(Tick salivary gland protein, TSGP)。

1.2.2 动物分组 试验家兔随机分为5组,A组(6只)编为A1、A2、A3、A4、A5、A6,B组(6只)、C组(3只)、D组(3只)和E组(3只)编号方法同A组。A和B组的家兔感染长角血蜱成蜱,C和D组的家兔用于抗原注射免疫,E组为空白对照。

1.2.3 攻蜱试验 A组为多次感染组,在初次感染长角血蜱的前一天,首先对家兔采血1~2 mL,收集血清,作相应的标记后冷藏备用,每只家兔背部剪毛后粘一布袋,每次在布袋内投放50只长角血蜱饥饿成蜱,每天观察、收集并统计长角血蜱叮咬、吸血和脱落的相关数据,以后每周采血1次,收集血清。间隔21 d感染1次,共感染5次。B组为1次感染组,每兔仅感染50只饥饿长角血蜱成蜱1次,与A组试验同期进行,每周采血。

1.2.4 免疫试验 C和D组家兔分别进行4次注射免疫和1次长角血蜱直接叮咬感染。C组为TSGP免疫组,D组为佐剂对照组,在注射免疫过程中,先进行基础免疫,然后用抗原免疫,C、D组家兔间隔21 d免疫1次,与A组同期进行,每周采血1次。免疫程序见表1。

1.2.5 饱血成蜱的收集 将各组兔体上每次吸血脱落的长角血蜱雌性成蜱逐个称重并记录结果。

1.2.6 ELISA法检测家兔抗体效价 用常规ELISA方法检测试验各组中每周家兔血清对长角血蜱的TSGP效价,将每组第1次感染蜱(或蛋白免疫)前所采集的血清、E组每次采集的血清混合后作为阴性对照,C组在免疫过程中前8次采集的血清等量混合后作为阳性对照。通过预试验确定TSGP的包被浓度,5组中每份兔血清按不同倍数稀释,血清、HRP(辣根过氧化物酶)标记的羊抗兔IgG均37℃作用1.5 h。在检测时,根据OD值的标准公式判定阳性。每份血清判为阳性的各个稀释度中,取最大稀释度作为其对TSGP的效价,然后作图分析。

## 2 结果

### 2.1 ELISA法检测各组血清抗体效价

经预试验检测,抗原包被的浓度为98 μg/mL,试验各组的抗体效价具有明显的差异,各组平均抗体效价详见表2。

A组中,家兔感染长角血蜱成蜱1周后,血清检测仍为阴性,第2周后发见阳性反应,此后随着叮咬

表 1 C 和 D 组家兔的免疫程序  
Table 1 The immunity procedure of group C and D

免疫次数 Immunity times	C 组(TSGP 免疫组) Group C(TSGP immunity group)		D 组(佐剂对照组) Group D(Control group)	
	免疫抗原和剂量 Antigen and dosage per rabbit	免疫方式 Approach of immunity	免疫抗原和剂量 Antigen and dosage per rabbit	免疫方式 Approach of immunity
第 1 次 First	2 mL Freund's Adjuvant (complete)		2 mL Freund's Adjuvant(complete)	
第 2 次 Second	1 mL Freund's Adjuvant (incomplete)+ 0.88 mg TSGP +1 mL PBS	背部皮下多点注射 Hypodermic injection on back of rabbit	1 mL Freund's Adjuvant (incomplete)+1mL PBS	背部皮下多点注射 Hypodermic injection on back of rabbit
第 3 次 Third	1 mL Freund's Adjuvant (incomplete)+ 0.88 mg TSGP+1 mL PBS		1 mL Freund's Adjuvant (incomplete)+1mL PBS	
第 4 次 Fourth	0.88 mg TSGP+2 mL PBS		2 mL PBS	
第 5 次 Fifth	50 只长角血蜱 饥饿成蜱叮咬 Infesting 50 hungered <i>H. longicornis</i> adult	背部叮咬 Infesting on back	50 只长角血 蜱饥饿成蜱叮咬 Infesting 50 hungered <i>H. longicornis</i> adult	背部叮咬 Infesting on back

表 2 各组血清平均效价

Table 2 The mean value of valence of antibody in each group

时间/周 Weeks	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
A 组 Group A	—	—	1	8	17	34	48	85	128	139	192	213	213	213	192	192	128	128	85
B 组 Group B	—	—	1	6	17	24	37	53	64	85	85	64	64	43	32	32	32	27	21
C 组 Group C		—	—	0.3	2	21	43	85	128	213	314	314	427	427	427	341	341	341	256
D 组 Group D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	17	43	64	85	128
E 组 Group E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

检测为阴性的血清标记为“-”，数值表示的均为判断为阳性血清效价

The negative serum denote as “-”, the figure is the mean value of valence of antibody of the positive serum

次数的增加,抗体效价逐渐上升,在第 11 周时抗体效价达到高峰,持续 3 周后逐步回落。在第 4 次、第 5 次用蜱感染后,家兔抗体效价均在 1 : 64 以上,表明随着感染长角血蜱次数的增加,家兔的抗体效价水平逐渐升高。

B 组家兔感染长角血蜱成蜱后,前 4 周的抗体水平基本与 A 组一致,第 9 周时效价达到最大值。与 A 组同期比较,第 4 周以后, B 组的抗体效价明显低于 A 组的同期水平,差异极显著( $P < 0.01$ ),表明多次感染长角血蜱能使家兔的抗体水平显著提高。

在 C 组(TSGP 免疫组)中,随着免疫次数的增加,家兔血清对 TSGP 的效价不断上升,在第 8 周时抗体效价均达到 1 : 128 以上,第 10 周时组内的血清

效价均在 1 : 256 以上,在第 12 周感染长角血蜱成蜱后,血清效价达高峰,平均滴度为 1 : 427。

D 组(佐剂对照组)中,前 12 周所收集的血清均为阴性,第 13 周感染了长角血蜱后抗体效价逐渐上升,抗体水平上升较快,该组作为佐剂对照组也较为理想。与 B 组初次感染长角血蜱后比较, D 组家兔同期的抗体效价相对增长较快,差异显著( $P < 0.05$ )。

E 组家兔的血清反应始终为阴性。

## 2.2 不同抗体水平对长角血蜱吸血和发育过程的影响

### 2.2.1 不同抗体水平对长角血蜱叮咬期、吸血期的影响

A 组家兔在每次感染长角血蜱的过程中,长

角血蜱的叮咬前期、吸血期差异很大(见表3)。可以看出,家兔的抵抗力较低(或初次叮咬)时,长角血蜱成蜱在投放后1~2 d基本能够叮咬在皮肤上开始吸血,从开始叮咬吸血到完全饱血脱落只需5~8 d。家兔有一定抵抗力(第2次叮咬)时,投放长角血蜱后在1 d内约有20%成蜱叮咬开始吸血,2 d内仅约有50%的蜱开始叮咬吸血,在6 d内大部分方相继叮咬吸血,叮咬期延长,超过1周末叮咬的蜱,则逐渐自然死亡;从攻蜱到雌蜱开始脱落需要10~15 d以上的时间,吸血期也相对延长。在抵抗力较强(第3次叮咬)时,只有部分长角血蜱能够叮咬吸血,大部分的成蜱在布袋内游走直至死亡;而且在兔体上吸血的长角血蜱,其吸血过程也明显延长,最长可

达15 d以上,大部分不能自然饱血脱落,脱落的长角血蜱雌蜱也出现畸形、内脏器官两侧发育不均衡、吸血脱落后体重相对较小等发育不良现象。家兔的抵抗力强(第4和第5次叮咬)时,叮咬期很长(10 d以上),大部分成蜱几乎无法叮咬,仅有部分长角血蜱能够吸血,而且吸血数天(超过15 d以上)才能达到半饱血程度,90%以上不能自然脱落,脱落的雌蜱高度发育不良。通过方差分析,第2次叮咬期和吸血期的长短与第1次差异均显著( $P < 0.05$ ),第3、第4和第5次的叮咬期和吸血期与第1次比较差异均极显著( $P < 0.01$ )。这说明家兔的抵抗力对长角血蜱的吸血过程影响较大,抵抗力强不利于长角血蜱吸血和发育。

表3 兔体不同抗体水平对长角血蜱叮咬吸血的影响

Table 3 The influence of different antibody titer of rabbits on *H. longicornis*

感染阶段 Phase of infestation	感染初期抗体水平 Antibody titer	叮咬时间/d Time of infesting*				吸血期/d Time of falling-off <sup>▲</sup>		
		20%	50%	80%	100%	开始脱落	大量脱落	大部分脱落
第1次 First	0	1	1	2	2	5	6~7	8
第2次 Second	8	1	2	3	7	10	11~15	≥15
第3次 Third	48	3	4	7	≥10	≥15	≥15	≥15
第4次 Fourth	139	4	7	10	≥10	≥15	≥15	≥15
第5次 Fifth	213	5~6	8	≥10	≥10	≥15	≥15	≥15

\*. 叮咬过程中死亡的蜱按已叮咬处理;▲. 在20 d后未脱落的蜱按死亡计

\* *H. longicornis* adult dead during the process of infestation was recorded as the having infested;▲. *H. longicornis* adult unfalling-off until 20 d was regarded as the dead

2.2.2 不同抗体水平对长角血蜱脱落率和死亡率的影响 A组中,随着长角血蜱感染家兔的次数增加,机体对长角血蜱的抵抗力水平不断地提高,从兔体上脱落的饱血雌蜱的比例也明显下降(见表4)。通过比较分析,随着家兔抵抗力水平的提高,死亡率

在不断地上升,在第4次、第5次感染蜱时死亡率达到98%以上,表明抵抗力水平越高,长角血蜱的死亡率越高。用SPSS软件分析,成蜱脱落率和家兔的抗体水平呈负相关( $r = -0.709$ ),长角血蜱死亡率与家兔的抵抗力水平成正相关( $r = 0.709$ )。

表4 A组不同抗体水平对长角血蜱雌蜱饱血脱落率和死亡率的影响

Table 4 The influence of different antibody titer with the rate of falling-off and mortality of female *H. longicornis* adult in group A

感染阶段 Phases of infestation	第1次	第2次	第3次	第4次	第5次
	First	Second	Third	Fourth	Fifth
感染长角血蜱总数/只 <i>H. longicornis</i> total number	300	300	300	300	300
感染初期抗体水平 Antibody titer when infesting	0	8	48	139	213
脱落的长角血蜱雌蜱数/只 The number of falling-off of female	105	28	8	3	2
雌蜱的饱血脱落率/% The falling-off rate of female	70.6	18.6	5.4	2	1.34
长角血蜱雌蜱死亡率/% Mortality of female	29.4	81.3	94.6	98	98.66

脱落率=饱血脱落的雌蜱总数/感染雌蜱总数×100%;死亡率=1-脱落率

Falling-off rate=The number of falling-off of female *H. longicornis* / Total number of female *H. longicornis* ×100%; Mortality=1-Falling-off rate

2.2.3 不同抗体水平对长角血蜱饱血雌虫体重的影响 A 组中,在不同抵抗力水平的兔体培养的长角血蜱,第 1 次(初次)叮咬脱落的雌蜱,体重增加明显,在 194.3~286.8 mg,平均体重的净增加值高,饱血程度好(见表 5)。随着家兔抵抗力增强,脱落

的雌蜱平均体重逐渐减小,脱落雌蜱的平均体重净增加值减小。方差分析结果显示,家兔体脱落的雌蜱平均活体重与其抗体水平呈负相关( $r = -0.867$ ),平均体重净增加值也与家兔的抵抗力水平呈负相关( $r = -0.867$ )。

表 5 A 组每次收集的长角血蜱饱血雌蜱的体重变化情况  
Table 5 Statistical data of female *H. longicornis* adult in group A

感染阶段 Phase of infestation	饥饿成蜱平均体重 /(mg/只) The average weight of <i>H. longicornis</i> adult	脱落后雌蜱的体重/(mg/只) Weight of blood-swollen		蜱体重平均净增加值 The clear added value
		体重范围 Range of weight	$\bar{x} \pm s$	
第 1 次 First	1.83±0.19	194.3~286.8	238.83±26.85	129.96
第 2 次 Second	1.83±0.19	73.1~165.6	123.66±38.44	67.35
第 3 次 Third	1.83±0.19	56.8~124.3	89.23±45.45	48.60
第 4 次 Fourth	1.83±0.19	26.5~40.8	31.84±6.33	17.34
第 5 次 Fifth	1.83±0.19	24.3~35.4	29.85±5.55	16.45

体重净增加值=(雌蜱脱落后体重-饥饿成蜱体重)/饥饿成蜱体重

The clear added value = (Weight of blood-swollen - Average weight of *H. longicornis* adult) / Average weight of *H. longicornis* adult

### 3 讨论

刺激宿主对蜱产生免疫反应的主要抗原来源于唾液,由唾液腺分泌<sup>[4-5]</sup>。大多数的唾液中含有粘结混合物以将蜱的口器固定于宿主的皮肤,各种各样的酶和不同类型的生物活性分子也来自于蜱的唾液腺和唾液<sup>[6-8]</sup>。本试验中,家兔从初次被长角血蜱感染到血清中抗体检测呈阳性,需要 1 周以上的时间。而研究认为,长角血蜱成蜱的唾液腺分泌的毒性成分,能抑制免疫系统应答,或长角血蜱具有免疫逃避的能力<sup>[9-12]</sup>,这可能是家兔产生特异性抗体的速度较慢的主要原因。同时进一步证明,唾液腺为蜱免疫研究的主要器官之一。

研究表明,蜱类在叮咬过程中,唾液腺分泌的唾液成分起着非常重要的作用,其中有的成分可以帮助蜱口器刺入宿主皮肤内,有的成分具有抗凝血作用<sup>[13]</sup>;有的成分能逃避宿主的免疫系统监视作用<sup>[13]</sup>;有的成分对宿主的神经系统有麻痹作用<sup>[14]</sup>。在长角血蜱初次叮咬时,家兔的抵抗力比较低,长角血蜱成蜱的唾液都能够发挥高效作用,有利于蜱顺利吸血,叮咬期和吸血期相对较短。在家兔被蜱叮咬后,不仅体液免疫(产生的抗体可以中和蜱唾液中的毒素)起作用,而且细胞免疫也起作用(对蜱的再次感染能够产生变态反应)<sup>[15]</sup>。随着叮咬次数增

多,宿主接触抗原的次数和量增多,家兔的抵抗力水平增强,而体液免疫和细胞免疫的协同作用不利于蜱的叮咬和吸血,这是造成蜱叮咬期和吸血期延长的主要原因。

目前,由于无法获得大量的特异性抗原,国内外均曾报道用 TSGP 免疫动物可以使动物具有抵抗力<sup>[16-19]</sup>,因此,可以用 TSGP 裂解物作为替代抗原检测家兔体蜱的感染情况。本试验结果表明,用唾液腺裂解蛋白免疫的家兔,主要表现为抗体水平高、维持时间长、免疫效果良好等特点,是理想的家兔抗长角血蜱阳性动物模型。

综合试验结果分析发现,血清中的特异性抗体滴度在 1:32 以上时,动物有较强的抵抗力,对长角血蜱的吸血和发育过程影响较大。本试验中,随着免疫次数的增加,家兔血清效价不断上升,在第 8 周时抗体效价均达 1:128 以上,至第 12 周达高峰,血清效价保持在 1:128 以上的时间达 10 周以上。在蜱的整个发育过程中,雌性成蜱的吸血时间最长,为 10~21 d。因而,试验结果足以保证长角血蜱完成一个发育阶段的吸血,表明成功构建了具有不同抵抗力的家兔活体免疫模型,为蜱的免疫学研究提供了理想的评价体系。同时,检测血清中特异性抗体的效价也可作为判定动物对长角血蜱抵抗力强弱的重要指标。

## 参考文献:

- [1] 孔繁瑶. 家畜寄生虫学[M]. 北京:农业出版社, 1981:293-296.
- [2] 邓国藩,姜在阶. 蜱螨亚纲 硬蜱科[M]//中国经济昆虫志. 北京:科学出版社. 1991.
- [3] 白 启,刘光远,韩根凤. 卵形巴贝斯虫在长角血蜱饱血雌虫及其卵内的发育形态观察[J]. 中国农业科学,1996,29(01):89-92.
- [4] 高金亮. 青海血蜱 cDNA 表达文库的构建和隐藏抗原基因的筛选、克隆与表达[D]. 北京:中国农业科学院,2004.
- [5] 薄新文,汪 明. 宿主对蜱免疫的研究进展[J]. 中国兽医杂志,1998,24(10):45-47.
- [6] WIKEL S K. Host immunity to ticks[J]. Ann Rev Entomol,1996; 41:1-22.
- [7] WIKEL S K, BERGMAN D. Tick immunology: significant advances and challenging opportunities[J]. Parasitol Today, 1997, 13(10):383-389.
- [8] WIKEL S K, ALARCON-CHAIDEZ F J. Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity[J]. Veterinary Parasitology,2001, 101:275-287.
- [9] WIKEL S K. The induction of host resistance to tick infestation with a salivary gland antigen[J]. Am J Trop Med Hyg, 1981,30: 284-288.
- [10] JAWORSKI D C, MULLER M T, SIMMEN F A, et al. *Amblyomma americanum*: identification of tick salivary gland antigens from unfed and early feeding females with comparisons to *Ixodes dammini* and *Dermacentor variabilis*[J]. Exp Parasitol, 1990,70: 217-226.
- [11] NUTTALL P A. Displaced tick-parasite interactions at the host interface[J]. Parasitology, 1998, 116 (Suppl.): S65-S72.
- [12] WIKEL S K, RAMACHANDRA R N, BERGMAN D K. Tick-induced modulation of the host immune response[J]. Int J Parasitol, 1998, 24: 59-66.
- [13] BOWMAN A S, COONS L B, NEEDHAM G R, et al. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence[J]. Med Vet Entomol, 1997, 11: 277-285.
- [14] 周金林. 蜱的功能分子的研究及其应用前景[J]. 动物医学进展,2004,52(1):53-56.
- [15] GOTHE R, NEITZ A W H. Tick paralysis: pathogenesis and etiology[J]. Advances in Disease and Vector Research, 1991, 8: 177-204.
- [16] WANG H, NUTTALL P A. Immunoglobulin-G binding proteins in the ixodid ticks, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma ariegatum* and *Ixodes hexagonus*[J]. Parasitology, 1995, 111: 161-165.
- [17] 程远国,吴厚永,李德昌,等. 长角血蜱唾液腺的生物学特性和功能的研究[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2000,7(3):175~182.
- [18] JOHNSTON L A, KEMP D H, PEARSON R D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks. Effects of induced immunity on tick populations[J]. International Journal for parasitology,1986, 16(1): 27-34.
- [19] INOJUMA H, KERLIN R L, KEMP D H, et al. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system[J]. Veterinary Parasitology,1993, 47:107-118.