

# 新孢子虫 dNcSRS2 重组蛋白间接 ELISA 的建立及其应用

刘 晶, 余劲术, 刘 群\*, 汪 明

(中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

**摘 要:** 利用新孢子虫体外重组表面蛋白 dNcSRS2 蛋白作为包被抗原, 对各项条件进行优化, 确定判定标准, 建立了检测新孢子虫血清抗体的间接 ELISA 方法。经对多例血清检测表明, 所建立的诊断试剂盒重复性好、特异性强、灵敏度高, 与进口的 IFAT 及两种商品化 ELISA 试剂盒的检测结果相比较, 符合率均达到 92% 以上。应用建立的 ELISA 方法对 236 份奶牛血清的新孢子虫抗体进行检测, 阳性率为 22%。这是国内首次利用重组蛋白建立的诊断试剂盒, 该方法的建立将为牛新孢子虫病的诊断与流行病学调查提供有效的技术手段。

**关键词:** 新孢子虫; dNcSRS2 重组蛋白; 间接 ELISA

中图分类号: S852.72<sup>+</sup>3; S854.4<sup>+</sup>3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)10-1036-06

## Establishment of Recombinant dNcSRS2 Protein Based Indirect ELISA for Detection of Antibody against *Neospora caninum* and Its Application

LIU Jing, YU Jin-shu, LIU Qun\*, WANG Ming

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** The purified recombinant dNcSRS2 protein was used as coating antigen to establish an indirect ELISA for detecting antibody against *Neospora caninum*. Commercially available diagnostic kits (IFAT and two commercial ELISA kits) for *N. caninum* were chosen as the reference standard methods. The results showed that the ELISA method was highly sensitive, specific and reproducible. The agreements between the methods were above 92%. Dairy cattle sera (n=236) were tested for antibodies to *N. caninum*; out of which 22% reacted positively. This is the first use of recombinant protein establishing diagnostic method in China. The new ELISA using dNcSRS2 could be used for mass screening of the prevalence of *N. caninum* infection in dairy cattle.

**Key words:** *Neospora caninum*; dNcSRS2 recombinant protein; indirect ELISA

新孢子虫病 (Neosporosis) 是由犬新孢子虫 (*Neospora caninum*, *N. caninum*) 感染多种动物所引起的原虫病。犬是犬新孢子虫的终末宿主, 牛、羊等多种哺乳动物以及野生动物可作为其中间宿主<sup>[1~3]</sup>。该病对牛的危害最为严重, 是世界范围内造成奶牛流产、产弱胎、死胎、木乃伊胎的主要原因之一<sup>[4~6]</sup>。我国在 2001—2004 年应用进口的试剂盒, 分别在北京、山西和河北等地区的奶牛血清中检

测到新孢子虫抗体<sup>[7]</sup>, 初步证明新孢子虫在我国奶牛中的存在。徐雪平应用进口诊断试剂检出 1 例新疆牦牛的新孢子虫血清抗体, 显示新孢子虫在我国牦牛中亦存在感染<sup>[8]</sup>。

迄今为止, 还没有防治新孢子虫病的有效药物和疫苗, 检出病牛后, 淘汰牛只及其他辅助措施是当前仅有的防治方法。检测牛群感染情况、快速诊断该病是防治新孢子虫病的前提。病原分离繁琐而复

收稿日期: 2005-12-16

基金项目: 国家自然科学基金 (30371080); “十五”攻关项目 (2004BA514A18B); 北京市自然科学基金 (6042016)

作者简介: 刘 晶 (1978-), 女, 黑龙江人, 博士生, 主要从事寄生虫学与寄生虫病学研究

\* 通讯作者: 刘 群, E-mail: qunliu@cau.edu.cn; Tel: 010-62732807

杂,检测血清中的抗体是切实可行的方法。在诸多检测新孢子虫血清抗体的方法中,ELISA 成为最常用的方法,国外已有多种 ELISA 试剂盒销售,但价格昂贵,不适合临床推广应用。我国尚未建立诊断方法。

近年来在新孢子虫分子生物学研究中发现的 NcSRS2(Nc-P43)是新孢子虫的主要表面蛋白,在速殖子、缓殖子阶段、致密颗粒以及棒状体中均表达<sup>[9, 10]</sup>。NcSRS2 是介导新孢子虫黏附和入侵宿主细胞的主要蛋白<sup>[11~13]</sup>,是最有希望的新孢子虫病诊断抗原和疫苗候选抗原之一<sup>[14, 15]</sup>。为此,我们在前期进行体外重组新孢子虫表面蛋白的基础上,截取表面蛋白基因,在体外表达出 dNcSRS2 重组蛋白(待发表),并作为包被抗原建立间接 ELISA 检测方法,以期开发出国产的、具有使用价值的诊断试剂盒,为新孢子虫的诊断与监测提供一种有效的技术手段。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒、载体

含有 NcSRS2 基因的质粒 P43 由代广大学日本动物原虫病研究所惠赠;构建的 pGEX-dNcSRS2 重组质粒由本课题组保存。

### 1.2 试验血清

间接荧光抗体检测(IFAT)用阴、阳性血清为 VMRD(美国)产品。阴、阳性血清为经过 IFAT 和 HIPRA(西班牙)的 ELISA 商品化试剂盒检测,判定为犬新孢子虫阳性和阴性的血清。

被检血清来源于北京(41 份)、天津(29 份)、哈尔滨(30 份)、山西(26 份)、新疆(40 份)、广西(28 份)、四川(42 份)7 个地区采集的共 236 份奶牛血清,在当地分离,运抵实验室后置  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 主要试剂

HRP-羊抗牛 IgG、FITC-羊抗牛 IgG 为 Southern Biotechnology Associates, Inc.(美国)产品。

新孢子虫 IFAT 试剂盒为 VMRD(美国)产品;新孢子虫抗体检测试剂盒为 IDEXX(美国)和 HIPRA(西班牙)产品。弓形虫抗体检测试剂盒为中国农业科学院兰州兽医研究所产品。

3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethyl Benzidine, TMB)为 Sigma 产品。96 孔单条可拆酶标板为 Costar 产品。Glutathione Sepharos<sup>TM</sup> 树脂柱为 Amersham pharmacia Biotech(美国)产品。

### 1.4 dNcSRS2 重组蛋白的制备

含有重组质粒 pGEX-dNcSRS2 的大肠杆菌 BL21 经诱导表达后收集菌体。经超声裂解,离心分别收集沉淀和上清,从菌株诱导获得的表达产物经 Glutathione Sepharos<sup>TM</sup> 树脂柱洗脱纯化,即作为 dNcSRS2 蛋白包被抗原。测定蛋白浓度,分装后于  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.5 dNcSRS2 重组蛋白间接 ELISA 检测方法的建立和结果判定

1.5.1 最佳抗原工作浓度和血清稀释度的测定 取纯化的 dNcSRS2 重组蛋白和已知阴、阳性血清进行系列稀释,方阵滴定。每个样本同时设与 dNcSRS2 蛋白相同浓度的 GST 蛋白为空白对照。在酶标仪上检测每孔  $\text{OD}_{450\text{nm}}/\text{OD}_{630\text{nm}}$  值。阴、阳性的判定值为包被 dNcSRS2 蛋白孔 OD 值减去相应的包被 GST 蛋白对照孔 OD 值。取阳性血清 OD 值为 1.0 左右,阳性血清 OD 值和阴性血清 OD 值之比(P/N 值)最高的反应孔的抗原及血清稀释度作为最佳抗原工作浓度和血清稀释度。

1.5.2 其他各项试验条件的优化 在最佳抗原工作浓度和血清稀释度优化测定结果基础上,分别进行抗原最佳包被条件、消除血清非特异性吸附条件、封闭液浓度、封闭时间、酶标二抗的稀释度、底物作用温度和时间的测定等优化试验。各项试验均按常规方法设计。按 P/N 值最大,且阳性血清 OD 值为 1.0 左右的原则确定最佳作用条件。

1.5.3 间接 ELISA 检测方法的建立 确定各项试验条件后,建立 dNcSRS2 蛋白间接 ELISA 操作程序。

1.5.4 间接 ELISA 检测方法临界值的确立 随机抽取无流产史的奶牛血清 30 份,经 IFAT 检测新孢子虫抗体为阴性,用已建立的间接 ELISA 方法检测,计算出 30 份血清的平均 OD 值( $\bar{x}$ )和标准方差(SD),阴、阳性临界值定义为阴性血清平均 OD 值  $\bar{x} + 3SD$ 。当待检样本 OD 值  $\geq \bar{x} + 3SD$  时,可在 99.9% 的水平上判定为阳性。

### 1.6 特异性试验

在同一条件下,将自建 ELISA 方法检测新孢子虫抗体为阳性的血清用直接凝集试验检测试剂盒进行弓形虫抗体的检测,将弓形虫抗体为阳性的血清进行新孢子虫抗体间接 ELISA 的检测。

### 1.7 重复性试验

用同一批制备的重组蛋白包被酶标板,取已知

抗体检测结果阴、阳性血清样品各一份,在其它条件不变的条件下,应用自建的 ELISA 进行检测,每份样品重复 6 个孔,根据 OD 值判定板内重复性;取不同时间制备的重组蛋白,连续 4 d 时间里对同一已知的阴、阳性血清样品检测,每次设 6 个重复孔,比较 4 d 的 OD 值,判定板间重复性。应用 Minitab 统计学软件分析统计学差异。

### 1.8 与 IFA 及其它商品化 ELISA 试剂盒的比较试验

取 VMRD 公司的 IFAT、IDEXX 公司的 ELISA 试剂盒(按内附说明操作)和已经建立的间接 ELISA 方法进行血清检测。分别将这两种商品化试剂盒的检测结果和自建间接 ELISA 方法的检测结果相比较,并且在两种商品化试剂盒之间进行比较。阴性血清中的阴性检出率即为特异性,阳性血清中的阳性检出率即为敏感性,两种方法检测结果一致的血清样本总数占总体样本的比例即为两者的符合率。

### 1.9 临床血清样本的检测

取北京、天津、哈尔滨、山西、新疆、广西、四川 7 个地区采集的奶牛血清样本共 236 份,分别用自建的间接 ELISA 方法和 HIPRA 公司的 ELISA 试剂盒进行新孢子虫血清抗体的检测,比较两者的检测结果。

## 2 结果

### 2.1 dNcSRS2 抗原蛋白的纯化

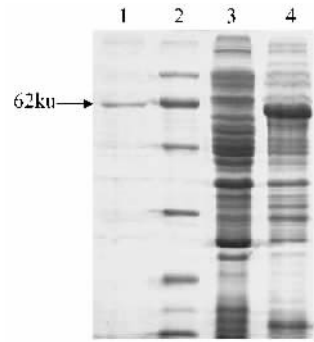
将纯化及未纯化蛋白的样品进行 SDS-PAGE,结果见图 1。从图 1 可看出,经纯化的 dNcSRS2 抗原蛋白经 SDS-PAGE 呈现单一的一条蛋白带。

### 2.2 ELISA 最佳工作条件的确定

#### 2.2.1 dNcSRS2 蛋白及各项试验条件的优化结果

通过方阵滴定,确定 dNcSRS2 蛋白抗原和 GST 蛋白最佳包被浓度为  $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,血清最佳稀释倍数为 1:50。抗原需经  $4^\circ\text{C}$  过夜包被。待检血清与含  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  GST 蛋白的血清稀释液  $4^\circ\text{C}$  过夜吸附,以消除其非特异性反应。

以含 5% 马血清的 PBST (PBS, pH 7.4, 0.05% Tween-20) 作为封闭液,在  $37^\circ\text{C}$  封闭 0.5 h 可达到良好的效果。待检血清最佳作用时间为  $37^\circ\text{C}$  1 h。HRP-羊抗牛 IgG 以 1:8 000 稀释, $37^\circ\text{C}$  作用 1 h。底物液 (0.1 mol/L 柠檬酸, 0.2 mol/L 磷酸钠, 0.03% 过氧化氢, 0.1 mg/mL TMB)  $37^\circ\text{C}$



1. 纯化的 dNcSRS2 蛋白; 2. 蛋白质 Marker; 3. 未诱导的 BL21 菌体; 4. IPTG 诱导的 BL21 菌体

1. Purified dNcSRS2 protein; 2. Protein molecular weight markers; 3. *E. coli* BL21 bacteria transformed with the tNcSRS2 plasmid not induced with IPTG; 4. *E. coli* BL21 bacteria transformed with the tNcSRS2 plasmid and cultured in the presence of IPTG

图 1 dNcSRS2 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 Analysis of purified dNcSRS2 proteins by SDS-PAGE

作用 20 min 后用 2 mol/L 硫酸终止反应。

2.2.2 间接 ELISA 方法操作程序的建立 96 孔酶标板上,用包被液 (0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6) 将 dNcSRS2 蛋白抗原和 GST 蛋白分别稀释到  $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,每孔  $100 \mu\text{L}$ ,于  $4^\circ\text{C}$  过夜包被。待检血清用含  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  GST 蛋白的血清稀释液 1:50 倍稀释, $4^\circ\text{C}$  过夜吸附。次日用 PBST (含 0.05% Tween-20 的 0.01 mol/L PBS) 洗涤酶标板 3 次,每次 3~5 min。加入封闭液,每孔  $100 \mu\text{L}$ , $37^\circ\text{C}$  封闭 0.5 h,同上洗涤。将待检血清分别加入样品孔和 GST 对照孔,每孔  $100 \mu\text{L}$ , $37^\circ\text{C}$  作用 1 h,同上洗涤。每孔加入  $100 \mu\text{L}$  1:8 000 稀释 HRP-羊抗牛 IgG  $37^\circ\text{C}$  作用 1 h,同上洗涤。再加入  $100 \mu\text{L}$  TMB 底物溶液  $37^\circ\text{C}$  作用 20 min,然后加入  $50 \mu\text{L}$  2 mol/L 硫酸终止反应。同时设阴性与阳性血清对照。

用酶标仪测定各孔  $\text{OD}_{450\text{nm}}/\text{OD}_{630\text{nm}}$  值,最终读数为包被 dNcSRS2 蛋白孔 OD 值减去相应的包被 GST 蛋白孔 OD 值。根据最终读数判定结果。

2.2.3 间接 ELISA 检测方法临界值的确定 经 IFAT 检测新孢子虫抗体为阴性的无流产产奶牛血清 30 份,用已建立的间接 ELISA 方法检测,计算出 30 份血清的最终平均 OD 值和标准方差(表 1),确定样本的 OD 终值  $\geq 0.2$  时,则判为新孢子虫抗体阳性;OD 终值  $< 0.2$  时则判为新孢子虫抗体阴性。

### 2.3 特异性试验

236 份血清分别进行自建间接 ELISA 方法检

测和弓形虫间接血凝抑制试验。结果显示新孢子虫血清阳性的奶牛其弓形虫血清抗体为阴性,弓形虫血清抗体为阳性的其新孢子虫血清抗体为阴性。两者之间无交叉反应。证明自建间接 ELISA 检测方法能有效鉴别新孢子虫和弓形虫的血清抗体。

表 1 ELISA 临界值的确定

Table 1 Determination of the cut off for ELISA

序号 No.	OD 均值 OD Value	序号 No.	OD 均值 OD Value	序号 No.	OD 均值 OD Value
1	-0.015	11	-0.098	21	-0.137
2	-0.023	12	-0.188	22	0.000
3	-0.163	13	0.089	23	-0.092
4	-0.081	14	0.086	24	0.047
5	-0.040	15	-0.019	25	-0.145
6	-0.206	16	-0.052	26	-0.051
7	0.049	17	0.050	27	0.065
8	-0.099	18	-0.047	28	-0.054
9	0.007	19	-0.034	29	-0.046
10	0.069	20	-0.114	30	-0.040

30 份血清最终 OD 平均值  $\bar{x} \pm SD = -0.040 \pm 0.080$

## 2.4 重复性试验

取已知阴性和阳性血清各一份在连续 4 d 里作

板内重复性试验和板间重复性试验(表 2)。统计学分析表明,血清的板间重复试验差异不显著( $P > 0.05$ )。证明自建的间接 ELISA 方法具有良好的可重复性。

## 2.5 与商品化试剂盒的比较试验

用自建的间接 ELISA 方法分别与 VMRD 公司的 IFAT 及 IDEXX 公司的 ELISA 试剂盒同时检测 50 份血清,比较结果如表 3、表 4 所示。由两表可以看出,本研究所建立的 ELISA 法与 VMRD 公司的 IFAT 和 IDEXX 公司的 ELISA 间的敏感性和特异性均较高,总符合率分别达到 92.0% 和 94.0%。而两种进口试剂盒之间的敏感性、特异性和总符合率也存在一定的差异。

## 2.6 临床血清样本的检测

用建立的间接 ELISA 方法及 HIPRA 公司的商品化 ELISA 试剂盒对来自 7 个地区的 236 份奶牛血清样本进行新孢子虫血清抗体的检测,结果表明各地区新孢子虫抗体的阳性率为 3.6% ~ 40.0%,样本的总阳性率为 20.3%。自建的 ELISA 方法与 HIPRA 的 ELISA 方法对全部样本血清检测结果见表 5。

表 2 板间重复性比较试验结果

Table 2 Results of repeatability test in ELISA plates

		重复孔 Repeated well					平均值 Average	
阳性 Positive	第 1 天	0.976	0.922	1.020	1.007	0.946	0.980	0.975
	第 2 天	1.089	1.003	0.953	0.985	0.981	1.001	1.002
	第 3 天	0.925	0.954	1.077	1.155	0.925	0.893	0.988
	第 4 天	0.998	0.974	0.936	1.009	1.016	0.885	0.962
阴性 Negative	第 1 天	0.021	0.016	0.020	0.019	0.021	0.018	0.0191
	第 2 天	0.018	0.017	0.014	0.021	0.021	0.019	0.0183
	第 3 天	0.015	0.019	0.017	0.023	0.017	0.025	0.0193
	第 4 天	0.020	0.019	0.018	0.017	0.018	0.021	0.0188

表 3 dNcSRS2 蛋白间接 ELISA 方法与商品化试剂盒的比较试验

Table 3 Results of comparison test between dNcSRS2 protein based indirect ELISA and commercial kits

dNcSRS2 蛋白间接 ELISA 方法	VMRD 公司 IFAT		IDEXX 公司 ELISA 试剂盒		总数 Total
	阳性 Positive	阴性 Negative	阳性 Positive	阴性 Negative	
阳性 Positive	29	1	29	1	30
阴性 Negative	3	17	2	18	20
总数 Total	32	18	31	19	50
敏感性 Sensitivity/%	90.6 (29/32)		93.5 (29/31)		
特异性 Specificity/%	94.4 (17/18)		94.7 (18/19)		
总符合率 Coincidence/%	92.0 (46/50)		94.0 (47/50)		

表 4 IDEXX 公司 ELISA 方法与 IFAT 的比较试验

Table 4 Results of comparison test between IDEXX Inc. ELISA and IFAT

IDEXX 公司 ELISA 试剂盒	VMRD 公司 IFAT		
	阳性 Positive	阴性 Negative	总数 Total
阳性 Positive	30	1	31
阴性 Negative	2	17	19
总数 Total	32	18	50
敏感性 Sensitivity/%	93.8 (30/32)		
特异性 Specificity/%	94.4 (17/18)		
总符合率 Coincidence/%	94.0 (47/50)		

### 3 讨论

新孢子虫自 1988 年发现以来关于其血清学诊断方法的研究层出不穷,其中包括间接荧光抗体试验(IFAT)、多种酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫印迹试验(IB)和直接凝集试验(DAT)<sup>[16~18]</sup>。IFAT 是用于证实新孢子虫抗体的第一个血清学试验<sup>[19]</sup>。该试验被认为是检测新孢子虫抗体的参考试验,相当于其他试验方法的“金标准”<sup>[20]</sup>。目前,ELISA 是针对新孢子虫血清抗体最常用的检测方法。

表 5 临床血清样本新孢子虫抗体的检测结果

Table 5 Detection of *N. caninum* antibody from bovine serum samples

地区 Area	样品数 Samples	自建 ELISA 方法			HIPRA 公司 ELISA				符合率/% Coincidence
		阳性 Positive	阴性 Negative	阳性率/% Positive ratio	阳性 Positive	疑似 Suspect	阴性 Negative	阳性率/% Positive ratio	
北京	41	9	32	22.0	7	1	33	19.5	97.6
天津	29	5	24	17.2	2	1	26	10.3	93.1
新疆	40	16	24	40.0	7	7	26	35.0	90.0
山西	26	6	20	23.1	6	0	20	23.1	100
广西	28	1	27	3.6	1	0	27	3.6	100
四川	42	2	40	4.8	3	0	39	7.1	97.6
哈尔滨	30	9	21	30.0	8	1	21	30.0	100
总计	236	48	188	20.3	34	10	192	18.6	92.8

HIPRA 公司 ELISA 试剂盒阳性率统计含疑似样品

Positive ratio of HIPRA'S ELISA kit included the suspect samples

我国目前尚未建立可行的方法用于新孢子虫病的诊断。NcSRS2 蛋白是新孢子虫表面蛋白,具有良好的特异性,前人研究表明 NcSRS2 蛋白能用于鉴别与其相近的弓形虫抗体。本试验在前期研究的基础上,应用新孢子虫重组蛋白 dNcSRS2 作为包被抗原,建立了间接 ELISA 检测方法。该重组蛋白为 GST 融合蛋白,可通过 Glutathione Sepharos<sup>TM</sup> 树脂柱简便地进行纯化。但是由于血清样本中通常含有 GST 抗体,因此在检测前首先要用纯化的 GST 蛋白进行吸附,以封闭与检测抗原的非特异性反应。此外每个样本设一个 GST 蛋白对照孔,以保证最终样本的 OD 值是新孢子虫抗体的吸光度而非与 GST 融合蛋白非特异性的结合。

自建的 ELISA 方法与商品化试剂盒共同检测 50 份血清样本,自建的方法与 IFAT 及自建方法与 IDEXX 公司的 ELISA 符合率分别达到 92.0% 和

94.0%。作为参考,以 IFAT 为标准与 IDEXX 的 ELISA 进行比较,两种商品化试剂盒的血清检测结果也存在差异。因而认为这种差异源于各检测方法所定标准不同,血清稀释比例不同或抗原性质不同,属于正常差异范围之内。例如,商品化试剂盒包被抗原为全虫抗原,血清中的特异性抗体较多因而敏感性较强,但也可能与弓形虫的抗体存在共同抗原,出现误诊的情况;本试验选用的是单一重组蛋白 dNcSRS2 包被,该种蛋白与弓形虫无交叉反应性,可以增加检测的特异性。从特异性、敏感性和重复性等各方面与商品化试剂盒进行比较,所建立的间接 ELISA 检测方法是可行的。

应用建立的重组蛋白间接 ELISA 方法对我国 7 个地区 236 份奶牛血清样本进行检测,同时与 HIPRA 公司的商品化 ELISA 试剂盒进行比较。自建 ELISA 检测结果:新疆地区血清新孢子虫抗体的

阳性率为 40%，居各地区之首，哈尔滨居次，为 30%。北京地区的奶牛血清阳性率与 2003 年的检测结果大致相符<sup>[7]</sup>。新疆地区的结果与 2002 年有很大出入<sup>[8]</sup>。根据结果分析可见，由于我国幅员辽阔，新孢子虫感染在我国各地分布不同，而且，在同一省份不同地区新孢子虫血清抗体检出率也有很大差异，如新疆。来自哈尔滨样本检测阳性率较高，与大部分血清采集自有流产史的牛有关，也证明新孢子虫病的确与奶牛流产有重要的关系，应该引起足够的重视。与 HIPRA 公司的商品化 ELISA 试剂盒进行比较，发现 HIPRA 的 ELISA 方法检测为疑似的血清样本在自建 ELISA 方法中多为阳性，说明自建的 ELISA 方法较 HIPRA 的 ELISA 阳性检出率更高，具有更高的敏感性。两者的总符合率也达到 92.8%。

综上所述，本研究利用 dNcSRS2 重组蛋白建立的检测牛血清中新孢子虫抗体的间接 ELISA 具有良好的重复性、特异性和敏感性，对试剂盒的进一步优化正在进行之中，相信能够为今后新孢子虫病的诊断与流行病学研究提供有效的技术手段。

#### 参考文献:

- [1] Moore D P. Neosporosis in South America [J]. Vet Parasitol, 2005, 127(2): 87~97.
- [2] Anderson M L, Andrianarivo A G, Conrad P A. Neosporosis in cattle [J]. Anim Reprod Sci, 2000, 60-61(1-3): 417~431.
- [3] Dubey J P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals [J]. Korean J Parasitol, 2003, 41(1): 1~16.
- [4] Crawshaw W M, Brocklehurst S. Abortion epidemic in a dairy herd associated with horizontally transmitted *Neospora caninum* infection [J]. Vet Rec, 2003, 152(7): 201~206.
- [5] Huang C C, Ting L J, Shiau J R, et al. An abortion storm in cattle associated with neosporosis in Taiwan [J]. J Vet Med Sci, 2004, 66(4): 465~467.
- [6] McAllister D, Latham S. Neospora 2001 [J]. Trends Parasitol, 2002, 18(1): 4~5.
- [7] 刘 群, 李 博, 齐长明, 等. 奶牛新孢子虫病血清学检测初报[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(2): 8~9.
- [8] 徐雪平, 陈志蓉, 薄文新, 等. 新疆部分地区牛新孢子虫病的血清学调查[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(5): 25~26.
- [9] Hemphill A, Gottstein B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites[J]. Parasitol Res, 1996, 82(6): 497~504.
- [10] Hemphill A, Felleisen R, Connolly B, et al. Characterization of a cDNA-clone encoding Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein[J]. Parasitology, 1997, 115 (Pt 6): 581~590.
- [11] Hemphill A. Subcellular localization and functional characterization of Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein[J]. Infect Immun, 1996, 64(10): 4 279~4 287.
- [12] Nishikawa Y, Xuan X, Nagasawa H, et al. Monoclonal antibody inhibition of *Neospora caninum* tachyzoite invasion into host cells[J]. Int J Parasitol, 2000, 30(1): 51~58.
- [13] Nishikawa Y, Tragoolpua K, Makala L, et al. *Neospora caninum* NcSRS2 is a transmembrane protein that contains a glycosylphosphatidylinositol anchor in insect cells[J]. Vet Parasitol, 2002, 109(3-4): 191~201.
- [14] Schares G, Rauser M, Sondgen P, et al. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis[J]. Int J Parasitol, 2000, 30(10): 1 123~1 130.
- [15] Nishikawa Y, Kousaka Y, Fukumoto S, et al. Delivery of *Neospora caninum* surface protein, NcSRS2 (Nc-p43), to mouse using recombinant vaccinia virus [J]. Parasitol Res, 2000, 86(11): 934~939.
- [16] Romand S, Thulliez P, Dubey J P. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection[J]. Parasitol Res, 1998, 84(1): 50~53.
- [17] Ahn H J, Kim S, Kim D Y, et al. ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (Nc-p43) fragment of *Neospora caninum* in bovine sera[J]. Korean J Parasitol, 2003, 41(3): 175~177.
- [18] Pinheiro A M, Costa M F, Paule B, et al. Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA [J]. Vet Parasitol, 2005, 130(1-2): 73~79.
- [19] Dubey J P, Hattel A L, Lindsay D S, et al. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission [J]. J Am Vet Med Assoc, 1988, 193(10): 1 259~1 263.
- [20] Bjorkman C, Uggl A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection [J]. Int J Parasitol, 1999, 29(10): 1 497~1 507.