

文章编号: 1000-7423(2010)-03-0200-05

【论著】

弩巴贝虫病间接 ELISA 检测方法的建立

龚真莉, 刘光远*, 谢俊仁, 柴慧萍, 张丽艳, 李知新, 田占成, 王路, 刘建刚

【摘要】 目的 克隆表达弩巴贝虫诊断抗原基因 BC48, 建立间接 ELISA 诊断方法。方法 从感染弩巴贝虫的毛驴血液中提取虫体基因组 DNA, 利用 PCR 技术扩增 BC48 基因, 将其克隆入表达载体 pET-28a, 转化大肠埃希菌感受态细胞, 用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 进行诱导表达, 用镍柱亲和层析法纯化蛋白。以该蛋白作为诊断抗原建立间接 ELISA 诊断方法, 对反应条件进行优化, 并对该方法的特异性和敏感性进行评价。结果 扩增获得 1 272 bp 的 BC48 基因片段。重组表达质粒 pET-28a-BC48 诱导后获得大小约为 M_r 46 000 的可溶性融合蛋白, 纯化后蛋白浓度为 12.98 mg/ml。间接 ELISA 方法条件优化的结果显示, 最佳抗原包被浓度为 65 μg/ml, 最适血清稀释度为 1:80, 该融合蛋白可特异性地与弩巴贝虫感染血清结合, 而不与马泰勒虫感染血清及阴性血清反应。使用该方法与镜检法检测 17 份散养毛驴血清样品, 阳性检出率分别为 3/17 和 2/17。结论 以 BC48 重组蛋白为抗原建立的间接 ELISA 方法可用于马属动物弩巴贝虫病的检测。

【关键词】 弩巴贝虫; BC48; 表达; 纯化; ELISA

中图分类号: S855.929 文献标识码: A

An Indirect ELISA for the Detection of *Babesia caballi* in Equine Animals

GONG Zhen-li, LIU Guang-yuan*, XIE Jun-ren, CHAI Hui-ping, ZHANG Li-yan, LI Zhi-xin, TIAN Zhan-chen, WANG Lu, LIU Jian-gang

(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)

【Abstract】 **Objective** To clone and express BC48 gene of *Babesia caballi*, and to establish an indirect ELISA for the diagnosis of *B. caballi* in equine animals. **Method** The genomic DNA of *B. caballi* was extracted from the infected donkey blood. BC48 gene was amplified by PCR. The PCR product was cloned into expression plasmid pET-28a, and expressed in *E. coli* BL21 with IPTG induction. The recombinant protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography and was used as a diagnostic antigen to establish an indirect ELISA. The reaction conditions of the indirect ELISA were optimized. Specificity and sensitivity of this method were evaluated. **Result** BC48 gene of *B. caballi* was 1 272 bp. The recombinant protein was expressed in *E. coli* BL21 as a soluble protein with a molecular weight of about M_r 46 000 under induction of IPTG. The concentration of purified protein was 12.98 mg/ml. The best conditions were obtained for the ELISA when the antigen concentration was 65 μg/ml with the serum dilution of 1:80. The protein specifically reacted with serum from donkey infected by *B. caballi*, but did not react with serum from donkey infected by *Theileria equi* (*B. equi*). Both ELISA and microscopy were applied to examine 17 donkeys in the field, 3 were positive by ELISA and 2 were found parasite-positive, respectively. **Conclusion** The indirect ELISA method may be used to detect *B. caballi* infection in equine animals.

【Key words】 *Babesia caballi*; BC48; Expression; Purification; ELISA

Supported by the Natural Resource Platform from Ministry of Science & Technology (No. 2005DKA21205-3) and the Hi-Tech Research and Development Program of China (No. 2006AA10A207)

* Corresponding author, E-mail: liuguangyuan2002@sina.com

基金项目: 国家科技基础条件平台项目 (No. 2005DKA21205-3); 国家高新技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (No. 2006AA10A207)

作者单位: 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫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

* 通讯作者, E-mail: liuguangyuan2002@sina.com

弩巴贝虫 (*Babesia caballi*) 和马泰勒虫 (*Theileria equi*, 旧称马巴贝虫 *B. equi*) 是马属动物的两个重要的致病性血液原虫, 主要流行于热带和亚热带地区^[1,2], 发病动物表现为发热、贫血、黄疸、嗜睡和水肿等特征, 严重感染者可致死^[1], 给养殖业可造成巨大的经

济损失^[3,4]。准确的早期诊断对该病的治疗非常重要。随着各种分子生物学方法的应用,一些重组抗原已广泛应用于各种检测方法。改进后的方法通常具有高通量、高敏感性和操作简单等特点^[5,6]。其中 ELISA 方法可通过不同功能性抗原的制备来改进反应的特异性,减少交叉反应,深受广大研究者和检测人员的喜爱^[7-9]。因此,本研究选用弩巴贝虫甘肃临潭株,通过建立间接 ELISA 检测方法,以期对该病进行早期诊断,及对近年来马属动物弩巴贝虫病的流行情况进行调查。

材料与方法

1 虫株、菌株和阳性血清

弩巴贝虫甘肃临潭株(CVCC3209)和马泰勒虫(CVCC10210)均由中国兽医微生物菌种保藏中心兰州分中心提供,经接种除脾宿主动物(毛驴)感染获得虫体。大肠埃希菌 JM109 和 BL21 (DE3)菌株由本实验室保存。弩巴贝虫和马泰勒虫阳性血清均通过虫体接种毛驴,感染发病后采血分离获得。

2 主要试剂

全血基因组 DNA 提取试剂盒购自美国 Gentra 公司, *rTaq* DNA 聚合酶、pMD18-T 载体、DNA 连接试剂盒、DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,限制性内切酶购自美国 Promega 公司,山羊抗毛驴二抗(Goat anti-donkey IgG)购自以色列 Biological 公司,表达载体 pET-28a、组氨酸结和树脂(His bind resin)和组氨酸结合预装柱均购自美国 Novagen 公司。其他试剂均为国产分析纯。

3 方法

3.1 目的基因的 PCR 扩增 取约 300 μ l 感染弩巴贝虫的毛驴血液,按试剂盒说明书操作,提取弩巴贝虫基因组 DNA。参考已发表的弩巴贝虫 BC48 基因序列(GenBank 登录号为 AB017700)设计引物,上游引物 BC48E-1: 5'-AC GGA TCC ATG GCT CCC AGC GAC TCT GTG GGC GAC-3', 下游引物 BC48E-2: 5'-AT GAA TTC CTA TTT CTC CAA TAA ATT ATC GGC CTC-3', 下划线部分分别为 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点。引物合成与测序由宝生物工程(大连)有限公司完成。PCR 反应体系: 10 \times PCR 缓冲液 5 μ l, 脱氧腺苷三磷酸(dNTP, 2.5 mmol/L) 4 μ l, 上下游引物(50 pmol/L)各 1 μ l, DNA 模板 2.8 μ g, *rTaq* DNA 聚合酶(2.5 U/ μ l) 0.5 μ l, 加灭菌去离子水至 50 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经胶回收、连接

至 pMD18-T 载体,构建重组质粒 pMD18-T-BC48,测序,并经 BLAST 网上检索分析同源性。

3.2 重组表达载体的构建 将目的基因 BC48 和表达载体 pET-28a 分别用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切,使用 *T*₄ DNA 连接酶进行黏端连接。将连接产物转化大肠埃希菌感受态细胞,在含有卡那霉素抗性的 LB 平板上筛选,挑选单克隆,摇菌过夜培养,提取质粒。经 PCR 和酶切鉴定,获得阳性重组质粒 pET-28a-BC48。测定阳性克隆的序列,以确保所构建的重组表达质粒读码框正确。

3.3 重组蛋白的诱导表达、可溶性检测及纯化 将重组质粒 pET-28a-BC48 转化至宿主菌 BL21(DE3),用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达,分别于诱导后 0、2、4、6 和 8 h 收集菌液,并设空载体对照。菌液经处理后通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和蛋白质印迹(Western-blotting)分析目的蛋白的表达情况、可溶性和抗原性。将收集的重组菌裂解后,用镍柱亲和层析法纯化蛋白,SDS-PAGE 检测纯化产物。

3.4 间接 ELISA 方法的初步建立和条件优化

3.4.1 条件优化 对封闭液、抗原包被浓度、血清稀释度、酶标二抗的稀释度及作用时间和底物作用时间等条件进行优化。分别以含 1、5 和 10 g/L 牛血清白蛋白(BSA)及鱼明胶的 PBST(含 0.5%吐温-20)作为封闭液进行封闭,确定最佳封闭条件。使用纯化的融合蛋白(即抗原,以 1:100 为基准,2 倍梯度稀释)包被 ELISA 反应板,一抗为自制的弩巴贝虫标准阳性血清(1:40),二抗为山羊抗毛驴 IgG(1:20 000),确定抗原最佳包被浓度。将抗原以最佳浓度包被,血清以 1:20 为基准,2 倍梯度稀释,二抗使用推荐浓度,筛选血清最佳稀释度。将酶标二抗分别以 1:5 000 为基准,2 倍梯度稀释至 1:4 0 000,在作用后 45 min 和 60 min 进行测定,确定最佳稀释度和酶标二抗的作用时间。分别于加底物后 20 min 和 30 min 终止反应,以确定底物作用时间。

3.4.2 特异性试验 用纯化的重组蛋白(1:200)作为抗原包被 ELISA 板,对马泰勒虫阳性血清进行检测。

3.4.3 敏感性试验 阳性血清稀释度分别为 1:20、1:40、1:80、1:160 和 1:320,其他条件为最佳反应条件。

3.4.4 间接 ELISA 检测方法判定标准的确定 根据统计学原理,阳性血清与阴性血清的比值(P/N) >3 表明反应结果与对照值间的差异有统计学意义,判定为阳性;P/N 值 <2 示反应结果与对照值之间差异无统计学意义,判定为阴性;而在 2 < P/N 值 < 3 时,判定

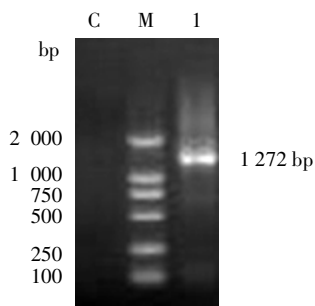
为可疑。

3.5 样品检测及与显微镜方法的对比 2008 年 5 月采集青海省部分县区的 17 份毛驴血液(湟源县 10 份, 贵南县 7 份), 采血前毛驴均无明显的临床症状。使用上述 ELISA 方法检测其血清, 对末梢血液涂片进行镜检, 计算阳性率。

结 果

1 目的基因的扩增

目的基因的扩增产物大小约为 1 272 bp, 与预期一致(图 1)。



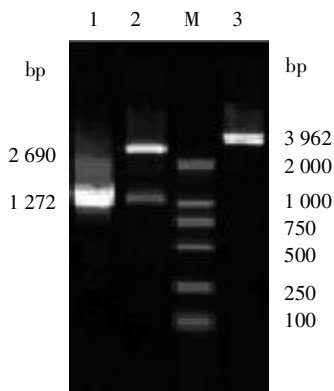
M: DNA 标志物; 1: PCR 扩增产物; C: 阴性对照。
M: DNA marker; 1: PCR product; C: Blank control.

图 1 BC48 基因扩增电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis analysis of BC48 PCR product

2 重组克隆质粒 pMD18-T-BC48 的构建与序列分析

重组质粒 pMD18-T-BC48 经双酶切和 PCR 扩增产物的电泳结果均出现约 1 272 bp 的特异性条带(图 2)。测序结果显示, 与已发表的 BC48 基因序列(登录号为 AB017700)的序列一致性达 97%, 证明已成功获得所需基因。



M: DNA 标志物; 1: 重组质粒 PCR 鉴定产物; 2: 重组质粒双酶切片段; 3: 重组质粒单酶切片段。

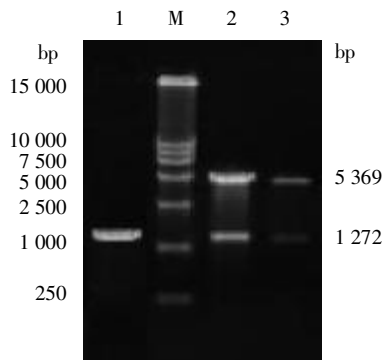
M: DNA marker; 1: PCR product of pMD18-T-BC48; 2: Double digestion of recombinant plasmid; 3: Single digestion of recombinant plasmid.

图 2 重组质粒 pMD18-T-BC48 的 PCR 及酶切鉴定

Fig.2 Identification of pMD18-T-BC48 by PCR and restriction endonuclease analysis

3 重组表达质粒 pET-28a-BC48 的鉴定

将筛选得到的阳性质粒进行 PCR 及 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 重组质粒已定向插入 pET-28a 载体(图 3)。阳性质粒测序结果与克隆质粒相符率达 100%, 即表达质粒构建成功。



M: DNA 标志物; 1: 重组质粒 PCR 鉴定产物; 2, 3: 重组质粒双酶切片段。

M: DNA marker; 1: PCR product of pET-28a-BC48; 2, 3: Double digestion of pET-28a-BC48.

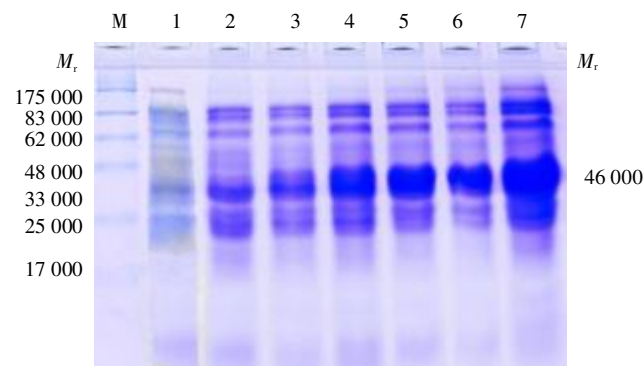
图 3 重组表达质粒 pET-28a-BC48 的 PCR 和酶切鉴定

Fig.3 Identification of pET-28a-BC48 by PCR and restriction endonuclease analysis

4 BC48 蛋白诱导表达及表达产物鉴定

含重组质粒 pET-28a-BC48 的大肠埃希菌经 IPTG 诱导表达后能表达约 M_r 46 000 的 BC48 融合蛋白, 从 0~8 h 呈逐渐递增趋势(图 4)。诱导 4 h 时, 目的蛋白即可达到较大的表达量, 8 h 时表达量最大。

Western blotting 结果显示, 重组蛋白 BC48 可被弩巴贝虫感染毛驴血清所识别(图 5), 说明重组融合蛋白成功表达并具有免疫反应活性。

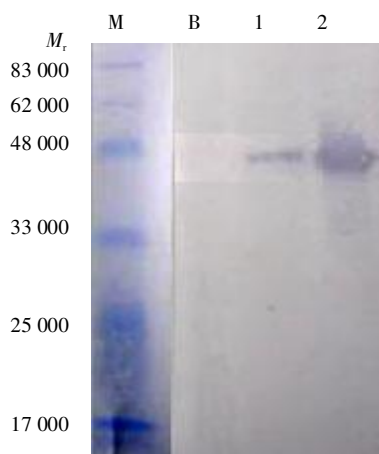


M: 蛋白质标志物; 1: 空载体诱导 4 h 菌液; 2~7: 分别为诱导 0、1、2、4、6 和 8 h 的菌液。

M: Protein marker; 1: pET-28a after induction by IPTG for 4 h; 2~7: *E. coli* BL21 (DE3) /pET-28a-BC48 after induction by IPTG for 0, 1, 2, 4, 6, and 8 h, respectively.

图 4 重组质粒 pET-28a-BC48 诱导表达的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the recombinant pET-28a-BC48



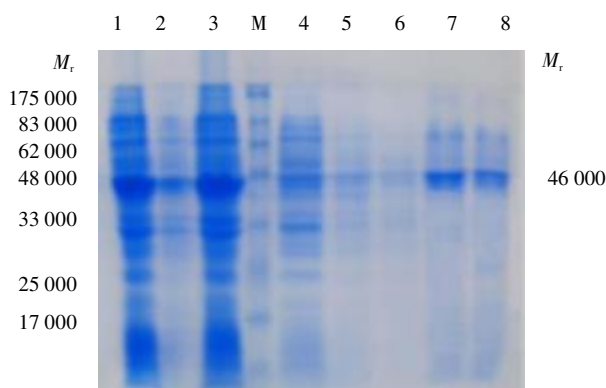
M: 蛋白质标志物; B: 阴性血清; 1: 纯化后蛋白; 2: 未纯化蛋白。
M: Protein marker; B: Negative serum control; 1: Purified protein; 2: Unpurified protein.

图 5 重组 BC48 蛋白 Western blotting 分析

Fig.5 Western blotting analysis of the recombinant BC48 protein

5 表达产物可溶性检测及蛋白纯化

细菌经细胞裂解缓冲液和超声处理的方法裂解诱导 4 h 后离心, SDS-PAGE 电泳结果显示, 目的蛋白 80% 以上存在于上清中(图 6), 表明目的蛋白以可溶性形式存在。蛋白经纯化后检测浓度为 12.98 mg/ml。



M: 蛋白质标志物; 1, 2: 裂解物上清液; 3: 全菌液; 4: 裂解物沉淀; 5, 6: 洗脱液; 7: 纯化蛋白第 1 次结合洗脱; 8: 纯化蛋白第 2 次洗脱。

M: Protein marker; 1, 2: Supernatant of lysed cells; 3: Whole bacteria; 4: Precipitation of lysed cells; 5, 6: Protein eluant; 7: Protein in the first elute fractions; 8: Protein in the second elute fractions.

图 6 重组蛋白 BC48 的可溶性检测及纯化

Fig.6 Solubility and purification of recombinant BC48 protein

6 间接 ELISA 检测方法的优化结果

优化结果显示, ① 确定用含 5 g/L BSA 的 PBST 液作封闭液; ② 抗原浓度为 1:200 时, A_{492} 及 P/N 值均较高, 确定抗原的最佳包被浓度为 65 $\mu\text{g/ml}$; ③ 血清浓度为 1:80 时 P/N 值最大, 阴性值较低, 据此确定最佳血清稀释度为 1:80 (表 1); ④ 酶标二抗

稀释度为 1:20 000 时阳性血清 A_{492} 和 P/N 值均较高, 阴性值较低, 作用时间在 45 min 和 60 min 时差异不明显, 因此确定酶标二抗的稀释度为 1:20 000, 作用时间为 45 min; ⑤ 分别于加底物后 20 和 30 min 终止反应, 两者的 P/N 值差异不大, 确定最佳底物作用时间为 20 min。

表 1 血清最适稀释度的确定

Table 1 Determination of an optimal dilution of serum

项目 Items	不同稀释度的 A_{492} 值 A_{492} values at different concentration of serum					
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
阳性血清 Positive serum	1.671	1.513	1.476	0.805	0.506	0.437
阴性血清 Negative serum	0.446	0.385	0.303	0.196	0.166	0.170
P/N	3.75	3.92	4.87	4.11	3.05	2.57

7 间接 ELISA 的特异性实验

结果显示, 不同稀释度 (1:20~1:1 208) 的马泰勒虫阳性血清与融合蛋白包被抗原反应, P/N 值均 < 2, 为阴性, 说明该间接 ELISA 方法与马泰勒虫阳性血清无交叉反应, 特异性较好。

8 间接 ELISA 的敏感性实验

将阳性血清以 1:20 为基准, 稀释至 1:320, 其余条件按最佳反应条件进行 ELISA 试验。结果显示, 当阳性血清稀释至 1:320 时, 检测结果恰好为阳性 (表 1)。

9 田间血清的检测及与显微镜方法的对比

间接 ELISA 法检出阳性血清 3 份, 镜检法检出阳性血涂片 2 份, 两者的阳性符合率为 100%。

讨 论

马属动物巴贝虫病是马类家畜的一种重要疾病, 在世界大部分地区都有发生。急性感染该病后存活下来的病畜往往转变为持续感染, 但涂片显微镜检查时极难查见虫体^[2,9]。长期带虫动物可作为感染整群动物的贮存宿主^[1,14]。巴贝虫病在感染后期往往由于病程的发展, 抗寄生虫类药物已不能达到治疗的效果而引起动物死亡, 所以该类疾病的早期诊断尤为重要^[15]。建立及改进诊断方法一是为了检测隐性感染动物, 二是进行巴贝虫病的鉴别诊断, 特别是几种巴贝虫并发感染时的诊断^[16,17]。

1969 年以来补体结合试验一直作为检测弩巴贝虫的标准监测方法。但是, 据报道该试验的敏感性和特异性较低, 并且不能正确区别阴性动物与带虫动

物^[4,5]。有部分研究者曾运用感染虫血作为检测抗原建立 ELISA 方法,但是由于虫血抗原种类多致使反应的特异性较差,交叉反应严重^[6]。因此,目前检测弩巴贝虫感染仍主要通过显微镜观察,镜检法可通过对血片进行吉氏染色或者瑞氏染色法直接检出虫体^[7]。虽然镜检法简单快捷,但不能精确辨别多种虫体的混合感染,且在感染率低或隐性感染时无法检测出,漏检率很高^[8,9]。

弩巴贝虫的 BC48 基因编码弩巴贝虫裂殖子管状蛋白,是该虫种较重要的保守基因^[17,18]。该蛋白是一种免疫显性的蛋白质,并且可作为疾病诊断的重要抗原^[3,10]。在欧洲、南美洲及中国流行的虫体中均存在。近年来有不少研究者对弩巴贝虫诊断方法进行研究,其中 Hiromi 等^[3,17]将 BC48 基因连接到 pGEX 4T 表达载体中,诱导表达融合蛋白,建立 ELISA 诊断方法,并证明该融合蛋白不与马泰勒虫等感染血清发生交叉反应。通过对蒙古中部地区 209 份田间样品的检测证明以该融合蛋白作为诊断抗原建立的 ELISA 方法既可用于诊断,也可用于疾病流行的调查^[3]。Kappmeyer 等^[16]和 Schwint 等^[18]通过实验证明,重组 RAP-1 是一种可作为血清学检测弩巴贝虫抗体的重组抗原。由此可见,该类裂殖子管状蛋白是检测弩巴贝虫感染的理想抗原。

本研究通过 PCR 扩增获得国内流行弩巴贝虫的 BC48 基因,与国际登录序列具有较高的同源性,说明了该基因的保守性,并且真实反映了国内流行虫种的特点。本研究选用 BC48 基因中最长、最能反映蛋白功能的一个开放阅读框进行表达。在大肠埃希菌中高效表达出融合蛋白,并利用表达的融合蛋白建立高特异性和敏感性的 ELISA 诊断方法。通过建立的 ELISA 方法检测若干份血清,可区分马泰勒虫和弩巴贝虫感染的马属动物血清及未感染该类寄生虫的血清。证明该蛋白可作为建立 ELISA 检测方法的抗原,并具有良好的特异性和敏感性。通过对田间样品的检测,证明该间接 ELISA 方法可作为疾病血清学诊断的重要手段。

参 考 文 献

- [1] Avarzed A, Igarashi I, Kanemaru T, *et al.* Improved *in vitro* cultivation of *Babesia caballi*[J]. J Vet Med Sci, 1997, 59(6): 479-481.
- [2] Cristina WC, Travis CM, Lowell SK, *et al.* Development of specific immunoglobulin G_a (IgG_a) and IgG_b antibodies correlates with control of parasitemia in *Babesia equi* infection [J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(6): 297-300.
- [3] Hiromi I, Xuan XN, Ikuko I, *et al.* Cloning and expression of a 48-kilodalton *Babesia caballi* merozoite rhoptry protein and potential use of the recombinant antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(11): 3475-3480.
- [4] Salim BO, Hassan SM, Bakheit MA, *et al.* Diagnosis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Sudan using ELISA and PCR[J]. Parasitol Res, 2008, 103(5): 1145-1150.
- [5] Xue SJ. Expression and preliminary application of *Babesia caballi* BC-48 gene fragments[D]. Yanbian; Yanbian University, 2007. (in Chinese)
(薛书江. 弩巴贝斯虫 BC_48 基因片段在大肠杆菌中的表达与初步应用[D]. 延边: 延边大学, 2007.)
- [6] Cristina WC, Lowell S, Kappmeyer, *et al.* Conformational dependence and conservation of an immunodominant epitope within the *Babesia equi* erythrocyte-stage surface protein equi merozoite antigen 1[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(6): 1301-1306.
- [7] Adam JB, Michael GL, Edward BB. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(9): 4172-4177.
- [8] Andy A, Oriol MMT, Naoaki Y, *et al.* Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmiasis[J]. Vet Parasitol, 2007, 143(2): 155-160.
- [9] Andy A, Wilawan P, Masashi O, *et al.* Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood[J]. Vet Parasitol, 2005, 129(1-2): 43-49.
- [10] Huang XH, Xuan XN, Naoaki Y, *et al.* Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens for the serodiagnosis of equine *Babesia* infections[J]. Vet Parasitol, 2006, 140(1-2): 158-161.
- [11] Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Sarana A, *et al.* Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects[J]. Vet Parasitol, 2003, 113(3-4): 189-201.
- [12] Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Sarana A, *et al.* Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history [J]. Vet Parasitol, 2003, 114(3): 173-194.
- [13] Xu YT, Zhang SF, Huang XH. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in horse in Jilin Province of China[J]. J Vet Med Sci, 2003, 65(9): 1015-1017.
- [14] Rampersad J, Cesar E, Campbell MD, *et al.* A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses[J]. Vet Parasitol, 2003, 114(2): 81-87.
- [15] Will LG, Terry FM, Carlos ES, *et al.* Competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a rhoptry-associated protein 1 epitope specifically identifies *Babesia bovis*-infected cattle[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003, 10(1): 38-43.
- [16] Kappmeyer LS, Perryman LE, Hinbs SA, *et al.* Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(7): 2285-2290.
- [17] Hiromi I, Claudia RO, Xuan XN, *et al.* Detection of *Babesia caballi* infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant 48-kDa merozoite rhoptry protein[J]. Int J Parasitol, 2000, 30(5): 633-635
- [18] Schwint ON, Ueti MW, Palmer GH, *et al.* Imidocarb dipropionate clears persistent *Babesia caballi* infection with elimination of transmission potential[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(10): 4327-4332.

(收稿日期: 2009-06-18 编辑: 杨频)