

田鼠巴贝虫可溶性抗原组分分析及其初步应用

张加¹, 司晨晨², 蔡玉春¹, 卢艳¹, 陈韶红¹, 陈家旭¹

摘要:目的 分析田鼠巴贝虫可溶性抗原,寻找可用于免疫诊断的有效抗原组分。方法 用田鼠巴贝虫感染 BALB/c 小鼠,待虫血症达高峰期时,收集田鼠巴贝虫虫体;采用超声法制备可溶性粗抗原(soluble babesia antigens, SBA)并包板,ELISA 检测血清特异性 IgG,评价 SBA 的免疫反应性、交叉反应性和特异性;以 SDS-PAGE 电泳分析 SBA 组分,并进行 Western Blot,分析其与感染鼠血清的反应性。结果 SBA-ELISA 法可检测早期感染(7 d)小鼠血清,且与恶性疟、间日疟弓形虫病阳性血清无交叉反应,显示出其较好的诊断敏感性和较高的特异性。通过 SDS-PAGE 分析,获得 5 条分子质量为 72、66、60、53、43 kDa 的主蛋白带和介于 14.4~116 kDa 的 7 条次带。经 Western Blot 分析,SBA 有 15 个抗原组分能被阳性小鼠血清识别,以 72、53、43、39、30 kDa 蛋白组分反应较强。结论 以 SBA 建立的间接 ELISA 可用于巴贝虫感染的有效筛查工具;田鼠巴贝虫可溶性抗原组分中 72、53、43、39、30kDa 为比较理想的抗原组分。

关键词:田鼠巴贝虫;可溶性抗原;SDS-PAGE;Western bolt;ELISA

中图分类号:R382

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2014)05-0469-05

Component analysis and preliminary application of soluble antigens of *Babesia microti*

ZHANG Jia¹, SI Chen-chen², CAI Yu-chun¹, LU Yan¹, CHEN Shao-hong¹, CHEN Jia-xu¹

(1. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control Prevention/WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis / Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH, Shanghai 200025, China;

2. School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

ABSTRACT: The soluble antigens of *Babesia microti* were analyzed in this study to screen effective antigen components for immunologic diagnosis. BALB/c mice were infected with *Babesia microti* (*B. microti*) and then polypide of *B. microti* was collected when parasitemia reached the peak. The soluble *Babesia* antigens (SBA) were prepared by Ultrasonic method. ELISA with SBA was applied to detect specific IgG in sera from *B. microti*-infected BALB/c mice and to evaluate reactogenicity and specificity of SBA. SDS-PAGE was used to analyze the component of SBA, and Western blot was used to analyze the reactivity with serum of infected mice. Results indicated that the established SBA-ELISA method could detect specific antibodies as early as 7 days post-infection in sera from BALB/c mice, which showed no cross reaction with positive serum of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Toxoplasma gondii*, thus indicating good sensitivity and specialty. In SDS-PAGE, 5 main protein bands with molecular mass at 72, 66, 60, 53, and 43 kDa and 7 minor bands at 14.4-116 kDa were obtained. In Western blot analysis, 15 antigen components in SBA could be recognized by positive serum of mice, during which protein component at 72, 53, 43, 39, and 30 kDa showed strong reaction. The results demonstrated that SBA components of *B. microti* are complex, during which antigen component at 72, 53, 43, 39, and 30 kDa were ideal, while their characteristics and diagnostic effect need to be further discussed.

KEY WORDS: *Babesia microti*; soluble *Babesia* antigens; SDS-PAGE; Western bolt; ELISA

Corresponding author: Chen Jia-xu, Email: chenjiaxu1962@163.com

通讯作者: 陈家旭, Email: chenjiaxu1962@163.com

作者单位: 1. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 卫生部寄生虫病原生物学重点实验室, 上海 200025;

2. 上海交通大学医学院, 上海 200025

田鼠巴贝虫病是一种人兽共患血液原虫病,由田鼠巴贝虫侵入人体红细胞引起,经蜱叮咬及输血传播^[1]。近几年来我国台湾^[2-3]、浙江^[4]、云南^[5]等地有该病的散发报道,逐渐引起重视。

由于目前国内缺少有效的巴贝虫病免疫诊断试剂,本研究通过制备田鼠巴贝虫可溶性粗抗原并进行组分分析,寻找敏感、特异的诊断抗原组分,为建立以可溶性粗抗原检测抗体的间接 ELISA 技术,用于田鼠巴贝虫病的初筛,为今后建立更加敏感、特异的诊断免疫诊断方法奠定基础。

为了解田鼠巴贝虫在我国云南边境地区的发病状况,本研究对中国疾病预防控制中心云南腾冲疟疾监测驻点收集的 231 份不明发热病人血清进行免疫学以及分子生物学检测。

1 材料

1.1 虫株 田鼠巴贝虫(*Babesia microti*) peabody mjr 株,购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC),货号:PRA-99。

1.2 实验动物 BALB/c 小鼠 33 只,购自中科院上海实验动物中心。

1.3 主要仪器和试剂 低温离心机(Thermo),摇床(THZ-C-1),超声仪(Misonix), -80°C 冰箱,液氮灌,生理盐水(上海长富制药公司),EDTA 抗凝采血管(浙江拱东医疗科技有限公司),percoll 分离液(Solarbio),红细胞裂解液(Solarbio),2D 裂解液,SDS-PAGE 试剂盒(上海 Beyotime 公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记抗小鼠 IgG 二抗(美国 Sigma 公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记抗人 IgG 二抗(试验室自制),HRP-DAB 显色试剂盒(天根生化科技有限公司),预染蛋白分子 marker(美国 fermentas 公司),蛋白上样缓冲液(北京鼎国生物科技有限责任公司),牛血清白蛋白(BSA,美国 Calbiochem 公司),硝酸纤维素膜(NC 膜),蛋白电泳仪、垂直电泳槽、转移电泳槽和凝胶成像系统均为美国 Bio-Rad 公司产品,酶标仪(美国 Thermo 公司)。

1.4 血清。

1.4.1 感染鼠血清 田鼠巴贝虫感染鼠血清。

1.4.2 不明发热患者血清 中国疾病预防控制中心云南腾冲疟疾监测驻点提供的 231 份不明原因发热病人血清。

1.4.3 其他寄生虫患者血清 恶性疟原虫病人血清、间日疟原虫病人血清、弓形虫病人血清均由本所提供。

1.2 方法

1.2.1 动物感染 从液氮罐中取出田鼠巴贝虫标准株,平衡至室温,用生理盐水进行等比稀释,吸取 0.2 mL 稀释后小鼠阳性全血,腹腔注射至 3 只 BALB/c 小鼠体内,薄血膜涂片连续观测虫血症的

变化,待虫血症达高峰时,摘眼球法采集全血至 EDTA 抗凝管内,用生理盐水进行等比稀释后,1 mL 注射器吸取 0.2 mL 稀释后小鼠阳性全血,腹腔注射至健康的 30 只 BALB/c 小鼠体内。

1.2.2 SA 制备 待虫血症达高峰时,眼眶采全血(约 1 mL)至 EDTA 抗凝管内,以 3 000 r/min 离心 10 min,将上层血清收集 -20°C 保存,下层血细胞用 6 mL 40% percoll 重悬,转移至 15 mL 离心管中,然后将 3 mL 70% percoll 缓慢加至管底,以 3 000 r/min 离心 20 min,吸去上清和白细胞层,用 5 倍体积红细胞裂解液将管底红细胞层重悬,置于摇床上冰浴 15 min,充分裂解,以 600 g 离心 10 min,将上清转移至 15 mL 离心管中。以 13 000 rpm 离心 10 min,PBS 缓冲液洗涤离心所沉淀,重复 3 次,去除残余的红细胞碎片。用适量 2D 裂解液重悬离心所得到的沉淀,并加入 PMSF 至终浓度为 1 mmol/L,超声 10 min,以 13 000 r/min 离心 1 h,离心获得的上清即为可溶性粗抗原,用考马斯亮蓝法(Bradford 法)测定其浓度, -20°C 保存备用。

1.2.3 SBA SDS-PAGE 分析:配制 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,上样量为 10 μL /孔,于电泳仪(电压 100 V)上电泳 1.5 h。电泳结束后用考马斯亮蓝染色 1 h,用脱色液脱色至本底无色,应用凝胶成像系统拍照,分析 SBA 的蛋白组分。

1.2.4 SBA Western blot 分析: SBA 经 SDS-PAGE 后电转至 NC 膜上,用 3% BSA 封闭过夜, PBST 洗涤 3 次,每次 10 min;分别加入 1 : 100 稀释的正常小鼠血清、感染小鼠血清,摇床孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次,每次 10 min;加入 1 : 500 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗小鼠 IgG 二抗,摇床孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入 DAB 底物显色液显色 5 min,用蒸馏水终止反应,观察结果。

1.2.5 SBA-ELISA 法的建立

1.2.5.1 SBA 最佳包被浓度确定 根据棋盘法原理,将 SBA 按照浓度梯度进行倍比稀释,每孔 100 μL , 4°C 过夜包被, PBST 反复洗板 3 次,每次 30 s,将板拍干后加入 100 μL 0.5% BSA, 37°C 封闭 4 h, PBST 反复洗板 3 次,每次 30 s,将板拍干后,以感染 30 d 的田鼠巴贝虫阳性血清为阳性样品,健康小鼠血清为阴性样品,将血清按 1 : 100 稀释后,相应每孔加入 100 μL , 37°C 孵育 1 h,将 HRP 标记羊抗小鼠 IgG 二抗按照 1 : 1 000、1 : 2 000、1 : 4 000 稀释,每孔加入 100 μL , 37°C 孵育 1 h, PBST 反复洗板 3 次,每次 30 s,将板拍干后,加入 TMB 显色液,

37 °C 避光,10 min 后加入 H₂SO₄ 终止反应,用酶标仪测 450 nm 波长处吸光度(A)值,以阳性样品孔 OD 值接近 1.0,阴性样品孔 OD 值小于 0.1 时的抗原包被浓度和二抗工作浓度作为最佳工作浓度。

1.2.5.2 间接 ELISA 方法学评价 根据棋盘法确定的最佳包被浓度和二抗工作浓度,对不同感染天数的田鼠巴贝虫阳性血清进行检测,观察抗体变化规律;对 30 份恶性疟原虫阳性病人血清、30 份间日疟原虫阳性血清、15 份弓形虫阳性血清进行检测,评价该方法的敏感性和特异性。

2 结 果

2.1 可溶性粗抗原制备 通过对获得的田鼠巴贝虫虫体进行涂片、吉姆萨染色,显微镜下可见大量田鼠巴贝虫虫体,纯度高(图 1)。虫体超声后获得的可溶性上清经蛋白定量浓度为 3.16 mg/ml。

2.2 SBA 最佳包被浓度确定 如表 1 所示,根据

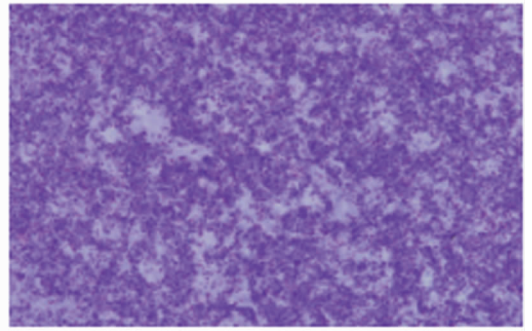


图 1 富集后微小巴贝虫虫体
吉姆萨染色涂片

Fig. 1 Giemsa stained smear of enriched *B. microti*

阳性样品孔 OD 值接近 1.0,阴性样品孔 OD 值小于 0.1 时的抗原包被浓度和二抗工作浓度作为最佳工作浓度的原则,确定最佳抗原包被浓度为 10.53 μg/mL,二抗最佳工作浓度为 1 : 2 000。

表 1 不同抗原包被浓度 SBA-ELISA 时的 OD 值

Tab. 1 OD value of antigen-coated SBA-ELISA in different concentrations

| 酶结合物工作浓度 Working concentration of enzyme conjugate | SBA 包被浓度(μg/mL) SBA coated concentration | | | | | | | | | |
|--|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 42.12 | | 21.06 | | 10.53 | | 5.27 | | 2.64 | |
| | 阳参 Positive control | 阴参 Negative control | 阳参 Positive control | 阴参 Negative control | 阳参 Positive control | 阴参 Negative control | 阳参 Positive control | 阴参 Negative control | 阳参 Positive control | 阴参 Negative control |
| 1 : 1 000 | 0.809 | 0.332 | 1.015 | 0.211 | 1.131 | 0.113 | 0.610 | 0.120 | 0.469 | 0.165 |
| 1 : 2 000 | 0.779 | 0.279 | 0.915 | 0.177 | 1.046 | 0.096 | 0.509 | 0.105 | 0.432 | 0.129 |
| 1 : 4 000 | 0.606 | 0.178 | 0.855 | 0.130 | 0.894 | 0.087 | 0.483 | 0.089 | 0.299 | 0.101 |

2.3 SDS-PAGE 分析 SBA 抗原组分 田鼠巴贝虫可溶性抗原经 SDS-PAGE 分析,获得 5 条分子质量为 72.66.60.53.43 KDa 的主蛋白带和介于 14.4~116 kDa 的 7 条次带(图 2)。

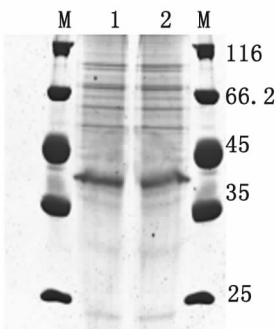


图 2 微小巴贝虫粗抗原 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE protein patterns of crude antigens of *B. microti*

M: Molecular mass marker; Lane: 1 and 2 *B. microti* soluble antigen.

2.4 Western blot 分析 经 Western Blot 分析,田鼠巴贝虫可溶性粗抗原复杂,SBA 有 15 个抗原组分能被阳性小鼠血清识别,以 72、53、43、39、30 kDa 蛋白组分反应较强(图 3)。

2.5 间接 ELISA 法的建立及不同感染天数的田鼠巴贝虫阳性血清抗体变化规律 当 BALB/c 小鼠感染田鼠巴贝虫第 7 d 开始,可以检测到抗体阳性,到 21 d 时抗体水平达到峰值,以后一直维持,至第 100 d,抗体滴度依旧维持在较高水平(如图 4)。

2.6 SBA-ELISA 法可检测早期感染(7 d)小鼠血清,且与恶性疟原虫、间日疟原虫及弓形虫阳性血清无交叉反应,显示出其诊断的敏感性和特异性(如图 5)。

4 讨 论

田鼠巴贝虫病是一种经蜱叮咬或输血传播的血液原虫病。人感染田鼠巴贝虫时,症状的严重程度

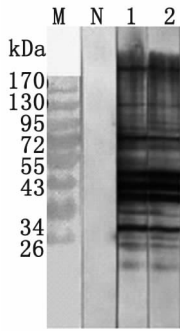


图3 Western Blot 分析 SBA 与感染田鼠巴贝虫不同天数的 BALB/c 小鼠血清反应条带

Fig. 3 Western blot analysis of SBA in the blood stream of the *B. microti*-infected BALB/c mice

M: Molecular mass marker; N: Sera from 0 days post-infected BALB/c mice; Lane 1: Sera from 30 days post-infected BALB/c mice; Lane 2: Sera from 60 days post-infected BALB/c mice

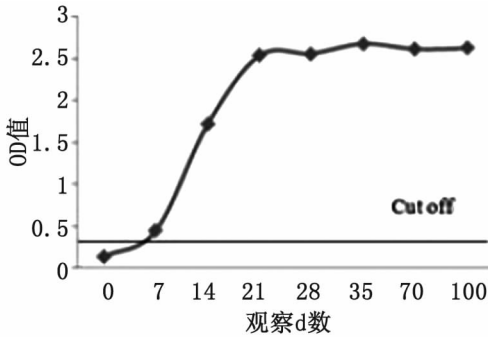


图4 小鼠感染巴贝虫抗体浓度变化规律

Fig. 4 Antibody concentration variation of infected mice

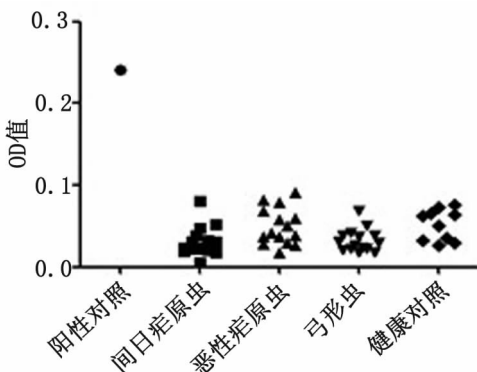


图5 其它血液原虫感染血清检测结果

Fig. 5 Sera test results for adjacent species

足够的认识,基层医疗单位没有针对田鼠巴贝虫病的专项检测,医务人员也无相关诊治经验,因此患者容易被误诊和漏诊^[6]。

近几年来,尽管人田鼠巴贝虫病仅在我国台湾、浙江等地出现过散发报道,然而在 1931—1944 年期间洪式间教授在热带病研究所刊物多次发表病例报告,研讨在人类红细胞内检测出一种类似动物疟原虫的问题^[7]。瞿逢伊教授等^[8]通过分析洪式间教授在《中华医学杂志》发表的文章中对虫体形态的描述,确认该病原体为巴贝虫。从 1931 年首例病例算起,我国首例巴贝虫病报道早于国外人体首例病例 13 年,且比国外首次发现巴贝虫早 5 年。因此中国可能是最早报道人巴贝虫病的国家。然而我国对田鼠巴贝虫病的流行状况尚缺乏足够的认识,且国内还没有实际有效的免疫诊断技术。因此建立快速有效的诊断方法,是发现病例和开展流行病学研究的关键前提。

尽管国内外已有文献报道用重组抗原检测田鼠巴贝虫抗体显示出了较高的敏感性,然而其共同的缺点是与其它疾病存在较高的交叉反应和假阳性^[9-12]。尤其是容易与疟原虫阳性血清出现交叉反应,且疟原虫在形态上与田鼠巴贝虫较难区分,容易将疟原虫误诊为巴贝虫的可能。因此,寻找更加理想的抗原分子可能是今后田鼠巴贝虫免疫学诊断研究的热点。相比重组抗原,可溶性粗抗原因其敏感性高、特异性好,且仍然是国内许多寄生虫病免疫诊断试剂盒制备的主要原材料。本研究通过对田鼠巴贝虫 SBA 进行抗原组分分析,获得 5 条分子质量为 72、66、60、53、43 kDa 的主蛋白带和介于 14.4~116 kDa 的 7 条次带,经 Western blot 初步鉴定,田鼠巴贝虫可溶性粗抗原中 72、53、43、39、30 kDa 为比较理想的抗原组分,各抗原组分的具体成份有待于通过质谱技术进一步鉴定,为后续重组表达单一抗原分子,建立更加敏感、特异的免疫诊断方法奠定了一定的基础。本研究用获得的可溶性粗抗原建立了间接 ELISA 诊断方法,通过连续检测感染田鼠巴贝虫小鼠血清内抗体滴度的变化,得知用粗抗原建立的间接 ELISA 法可在小鼠感染 1 周内检测出阳性,显示出较高的灵敏度。用建立的间接 ELISA 法检测其它血液原虫感染人血清,结果显示与其它血液原虫感染血清抗体无交叉反应,由于在交叉反应评价中所选用的样本数量较小,因此这一结果有待通过扩大样品量进一步核实。

综上所述,用田鼠巴贝虫可溶性粗抗原建立的

(下转第 478 页)

与人的年龄、虫血症水平、机体的免疫水平以及是否切除脾密切相关。轻者可以表现为隐性感染,重者会导致病人死亡。通常隐性感染者没有明显发病症状或只出现一过性的发热症状,患者不易察觉,在其参与义务献血时,便成为了输血传播田鼠巴贝虫病的潜在威胁^[1]。部分表现出症状的感染者多数以不明原因发热就诊,由于我国对田鼠巴贝虫病尚缺乏

- 1016/j.ibmb.2006.10.007
- [11]Wu JH, Cheng JZ, Sun Y, et al. Selection of control genes in Real-time qPCR analysis of gene expression in *Aedes albopictus* [J]. Chin J Zoonoses, 2011, 27(5): 432-435. (in Chinese)
吴家红,程金芝,孙宇,等. 白纹伊蚊基因表达定量 PCR 内参基因的选择[J]. 中国人兽共患病学报,2011,27(5):432-435.
- [12]Jiang H, Kanost MR. Characterization and functional analysis of 12 naturally occurring reactive site variants of serpin-1 from *Manduca sexta*[J]. J Biol Chem, 1997, 2(272): 1082-1087. DOI: 10.1074/jbc.272.2.1082
- [13]Tong Y, Kanost MR. *Manduca sexta* serpin-4 and serpin-5 inhibit the prophenoloxidase activation pathway: a cDNA cloning, protein expression, and characterization [J]. J Biol Chem, 2005, 15(280): 14923-14931. DOI: 10.1074/jbc.M500531200
- [14]Scherfer C, Lemaitre B. Drosophila Serpin-28D regulates hemolymph phenoloxidase activity and adult pigmentation[J]. Developmental Biol, 2008, 323: 189-196. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.08.030
- [15]Garrett M, Fullaondo A. Identification and analysis of serpin-family gene by homology and synteny across the 12 sequenced Drosophilid genomes[J]. Genomics, 2009, 2(10): 489-501. DOI: 10.1186/1471-2164-10-489
- [16]Danielli A, Kafatos FC. Cloning and characterization of four Anopheles gambiae serpin Isoforms, differentially induced in the midgut by Plasmodium berghei invasion[J]. Biol Chem, 2003, 6(278): 4184-4193. DOI: 10.1074/jbc.M208187200
- [17]Abraham EG, Pnto SB, Ghosh A, et al. An immune-responsive serpin, SRPN6, mediates mosquito defense against malaria parasites[J]. PNAS, 2005, 45(102): 16327-16332. DOI: 10.1073/pnas.0508335102
- [18]Zhang TJ. Review of bioinformatics data analysis in alternative splicing[J]. China J Bioinformatics, 2012, 10(1): 61-64. (in Chinese)
章天骄. 可变剪接的生物信息数据分析综述[J]. 生物信息学, 2012,10(1):61-64. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5565.2012.01.13
- [19]Wu JH, Cheng JZ, Chen L, et al. Expression of the genes of Adenosine Deaminase, C-lectin an Serpin in the salivary gland of *Aedes albopictus* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2010, 28(3): 190-193. (in Chinese)
吴家红,程金芝,陈璐,等. 腺苷脱氨酶、C型凝集素及丝氨酸蛋白酶抑制剂基因在白纹伊蚊唾液腺中的表达[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2010,28(3):190-193.

收稿日期:2013-10-08;修回日期:2014-03-11

(上接第 472 页)

间接 ELISA 法可用于田鼠巴贝虫病血清抗体的检测,通过有效抗原组分明确了理想抗原的分子量大小范围,为今后筛选重组抗原分子奠定了基础。

参考文献:

- [1]Vannier E, Krause PJ. Human babesiosis[J]. N Engl J Med, 2012, 366: 2397-2407. DOI: 10.1056/NEJMr1202018
- [2]Shih CM, Liu LP, Chung WC, et al. Human babesiosis in Taiwan: asymptomatic infection with a Babesia microti-like organism in a Taiwanese woman[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35: 450-454.
- [3]van Peenen PF, Chang SJ, Banknieder AR, et al. Piroplasm from Taiwanese rodents[J]. J Protozool, 1977, 24: 310-312.
- [4]Yao LN, Ruan W, Zeng CY, et al. Pathogen identification and clinical diagnosis for one case infected with *Babesia* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2012, 30: 118-121. (in Chinese)
姚立农,阮卫,曾长佑,等. 1 例人感染巴贝虫的诊断与病原体鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2012,30:118-121.
- [5]Zhou X, Li SG, Chen SB, et al. Co-infections with Babesia microti and Plasmodium parasites along the China-Myanmar border [J]. Infect Dis Poverty, 2013, 2(1): 24.
- [6]Krause PJ. Babesiosis diagnosis and treatment[J]. Vector-Borne Zoonotic Dis, 2003, 3(1): 45-51.
- [7]Hung SL. Notes on a species of malaria parasite finding from Beibei[J]. Nat Med J China (Chongqing ed), 1944, 19: 571-573. (in Chinese)
- [8]Qu FY. Historical review on the development of medical parasitology in China during the years of 1871-2006[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25(4): 259-273. (in Chinese)
瞿逢伊. 我国医学寄生虫学发展百年历史回顾与评述[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(4): 259-273.
- [9]Ooka H, Terkawi MA, Cao S, et al. Molecular and immunological characterization of a novel 32-kDa secreted protein of *Babesia microti* [J]. J Parasitol, 2012, 98: 1045-1048. DOI: 10.1645/GE-2999.1
- [10]Ooka H, Terkawi MA, Goo YK, et al. *Babesia microti*: molecular and antigenic characterizations of a novel 94-kDa protein (BmP94) [J]. Exp Parasitol, 2010, 127: 287-293. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.03.018
- [11]Luo Y, Jia H, Terkawi MA, et al. Identification and characterization of a novel secreted antigen 1 of *Babesia microti* and evaluation of its potential use in enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic test [J]. Parasitol Int, 2010, 60: 119-125. DOI: 10.1016/j.parint.2010.11.001
- [12]Priest JW, Moss DM, Won K, et al. Multiplex assay detection of immunoglobulin G antibodies that recognize *Babesia microti* antigen [J]. Clin Vaccine Immunol, 2012, 19: 1539-1548. DOI: 10.1128/CVI.00313-12

收稿日期:2014-02-12;修回日期:2014-03-12