

文章编号: 1004-0374(2010)09-0873-05

新孢子虫侵入宿主细胞的研究进展

武晓燕, 黄晓红*

(福建师范大学, 福建省发育与神经生物学重点实验室, 福州 350108)

摘要: 概述了新孢子虫侵入宿主细胞的过程以及与侵入有关蛋白质的最新研究进展, 指出新孢子虫侵入机制的深入探讨将为新孢子虫病的预防和快速诊断建立有效而实用的方法, 并对新孢子虫疫苗以及新孢子虫新药物的研制提供新的策略。

关键词: 新孢子虫; 侵入过程; 宿主细胞; 疫苗

中图分类号: S852.723 **文献标识码:** A

Research progress on host cell invasion by *Neospora caninum*

WU Xiao-yan, HUANG Xiao-hong*

(Fujian Provincial Key Laboratory of Development and Neurobiology, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

Abstract: The recent advances in the invasion process and proteins relating to invasion of host cell by *Neospora caninum* were reviewed in this paper. It was proposed that effective and practical method for neosporosis prevention and rapid diagnosis would be established and new strategies would be provided through studying the invasion mechanism of *Neospora caninum*.

Key words: *Neospora caninum*; invasion process; host cell; vaccine

犬新孢子虫隶属于原生动动物门(Protozoa)、顶复亚门(Phylum Apicomplex)、孢子虫纲(Class Sporozoa)、真球虫目(Eumeriina)、肉孢子虫科(Sarcocystidae)、新孢子虫属(*Neospora*), 营寄生生活。1984年首次由挪威兽医学专家Bjerkas在患脑炎和肌炎的犬体内发现了原虫, 并证实该原虫属于顶复亚门, 但未能对该虫进行鉴定^[1]。1988年, 由美国Dubey博士描述并命名, 从而与其在形态学上相似的刚地弓形虫有了区分^[2,3]。迄今, 新孢子虫的生活史尚未完全阐明。已知犬、郊狼是犬新孢子虫的终末宿主^[4]; 牛、绵羊、山羊、犬、马、鹿等多种哺乳动物均是其中间宿主^[5,6]。新孢子虫的主要危害是引起母畜流产、死胎、新生胎儿运动障碍和神经系统疾患等疾病。新孢子虫已经在世界范围内广泛传播, 澳大利亚、新西兰、比利时等30多个国家均有发生, 我国周边的日本、韩国和我国青海、延边等地区都有报道, 牛、绵羊、山羊、

马、鹿等均可感染。到目前为止, 新孢子虫的疫苗还处于研制阶段, 暂无有效的疫苗控制新孢子虫的传播。它已给畜牧业生产造成巨大的经济损失。研究新孢子虫速殖子侵入宿主细胞的分子机制, 对新孢子虫病的有效预防和快速诊断方法的建立有着极其重要的意义, 因此成为当前新孢子虫研究的热点之一。本文将就这方面的进展加以综述。

1 新孢子虫侵入宿主细胞的过程

新孢子虫的速殖子大小约为 $7 \times 2 \mu\text{m}$, 呈半月形。它能够自主地侵入大量宿主细胞, 其入侵过程是连续复杂的, 包括黏附和侵入两个过程, 每个过

收稿日期: 2010-03-15; 修回日期: 2010-04-19

基金项目: 福建省自然科学基金重点项目(2008J0004); 福建师范大学人才建设经费

*通讯作者 E-mail: biohxh@fjnu.edu.cn

程都需要能量^[7]。速殖子在与宿主细胞接触的瞬间,信号从表面传导到虫体前端。该信号诱导虫体再定位,微线体胞外分泌蛋白,微线体蛋白与宿主细胞膜上的相应受体结合形成可移动的连接区域。其后,棒状体胞外分泌蛋白修饰宿主细胞;同时,虫体在其原生质膜下的肌动-肌球蛋白马达^[8,9]所产生的自身滑动力的作用下,前端向前,迅速挤过连接区域,进入宿主体内。在侵入过程中,新孢子虫的形态几乎不变。随着虫体的移位,连接区域也向后移动,当虫体完全侵入后,连接区域在虫体后面融合,内陷部分在宿主体内形成纳虫泡,虫体居于纳虫泡内,位于宿主细胞核的附近^[10,11]。致密颗粒在纳虫泡空间胞外分泌蛋白。与弓形虫不同的是,新孢子虫线粒体与内质网不环绕纳虫泡周围^[12]。纳虫泡形成初期,其成分与被侵入的宿主细胞膜几乎一样,但随着虫体棒状体蛋白、致密颗粒蛋白及其他一些因子对纳虫泡膜的修饰^[12],纳虫泡膜中原有的一些膜成分被迅速排出。虫体自身对纳虫泡成分的修饰,使其可以避免宿主细胞溶酶体的裂解及酸化作用,并与泡外液体及宿主的内吞噬系统隔离^[13,14]。在纳虫泡内,新孢子虫以二分裂方式迅速繁殖。在繁殖5~6代,约48~72 h后,在与引起虫体侵入宿主细胞相同的信号系统的作用下,宿主细胞裂解,释放出新孢子虫速殖子。释放的速殖子又侵入新的宿主细胞,完成新一轮侵入、繁殖和释放。

2 与侵入有关的蛋白质

在侵入过程中,虫体与宿主细胞存在受体-配体的相互作用。在侵入宿主细胞的过程中,虫体表面抗原、微线体蛋白、棒状体蛋白、致密颗粒蛋白等都起着重要的作用。

2.1 虫体表面抗原(surface antigens, SAGs)

表面抗原位于虫体表面,它在寄生虫与宿主细胞的相互作用中起很重要的作用。到目前为止,已知的与虫体侵入有关的虫体表面蛋白有SAG1、SRS2、Nc-p43、NcP0^[15]和p38^[16]。体外抗体中和试验表明,抗SAG1和SRS2的单克隆和多克隆抗体均可以抑制新孢子虫速殖子黏着和入侵宿主细胞^[17-19]。Pinitkiatisakul等^[20]重组的NcSRS2蛋白免疫小鼠能诱导小鼠体内产生天然的抗NcSRS2的抗体,竞争PCR检测接种重组NcSRS2疫苗的小鼠脑中的新孢子虫DNA,结果显示在10只小鼠的脑组织中有7只含新孢子虫DNA;10只接种了与NcSRS2相似,但与NcSRS2无关的重组疟疾肽M5做对照组的小鼠脑

组织中都可以检测到新孢子虫DNA;而在10只未感染新孢子虫的脑组织中未检测到虫体DNA。以上结果表明,用重组的NcSRS2蛋白去免疫小鼠可以减少脑部新孢子虫的增殖,说明虫体表面蛋白NcSRS2在黏附宿主细胞方面起作用。用抗NcSRS2和NcDG1(*N. caninum* dense granule antigen1)结合的重组抗原作为疫苗可以抑制新孢子虫侵入宿主细胞,抑制率达到了67.5%^[21]。以上结果说明SAG1、SRS2可以结合到宿主细胞表面。另外,用亲和纯化的抗Nc-P43抗体可以抑制*N. caninum*速殖子侵入宿主细胞,黏着的抑制率为44%,入侵的抑制率为36%^[10]。Zhang等^[15]采用荧光免疫法证明NcP0位于速殖子表面,并且研究证明重组的NcP0 IgG抗体可以有效抑制新孢子虫的增长,抑制率达到了(52.5±3.6)%。到目前为止,p38在侵入宿主细胞过程中的作用未有深入的研究,这一问题有待探讨。

2.2 微线体蛋白(micronemes, MICs)

微线体蛋白存在于新孢子虫前端的分泌器官微线体中,这类蛋白通常含有一系列保守的黏附性表位。目前为止,已经报道的具有潜在可黏附的微线体蛋白有NcMIC1^[22]、NcMIC2^[23]、NcMIC4^[24]和膜结合微线体蛋白NcMIC3^[9,25]。这4种微线体蛋白均具有一个或多个黏附基序,都是具有跨膜区的膜蛋白,从而能与宿主细胞表面受体特异性结合,并进入靶细胞。这些黏着基序分别是:NcMIC1含有类凝血酶敏感素结构域^[22],NcMIC2含类整联蛋白和类凝血酶敏感素结构域^[23],NcMIC3含有类表皮生长因子结构域^[25]。犬新孢子虫与宿主细胞结合的方式和刚地弓形虫的相似,都是虫体与硫酸化的细胞表面多聚糖位点相结合;但与刚地弓形虫不同的是,新孢子虫速殖子首先与硫酸软骨素糖胺聚糖相结合,而刚地弓形虫优先与硫酸乙酰甘素残基结合^[26]。例如,NcMIC3由速殖子的顶端分泌,它的特有结构域可以与宿主细胞表面类表皮生长因子结构位点相结合,并且NcMIC3-EGF-like区域已经在大肠杆菌中得到体外表达,也证明该结构可以与细胞表面的硫酸软骨素相结合^[26],从而介导虫体与宿主细胞黏着,但与侵入宿主细胞无关^[22,27]。另外,NcMIC1、NcMIC2和NcMIC4也都可以与硫酸化的宿主细胞表面葡萄糖胺聚糖相结合。Naguleswaran等^[9]在将宿主细胞表面糖基化的位点敲除或者对宿主细胞表面葡萄糖胺聚糖进行修饰后可以使NcMIC1与宿主细胞的结合能力下降;体外37℃培养新孢子虫速殖子证明微线体蛋白的分泌在寄生虫排出宿主细胞时就

已完成,并推测*M. caninum*微线体蛋白与*T. gondii*相似,在微线体蛋白分泌、运输和释放过程中,它们以复合体形式起作用^[28]。

2.3 棒状体蛋白(rhoptry proteins, ROPs)

在虫体侵入及对纳虫泡修饰过程中,棒状体蛋白起着重要作用。在虫体侵入宿主细胞时,随着微线体蛋白的分泌,棒状体蛋白也被排放到虫体外,它与纳虫泡膜的形成及其功能有关,但导致蛋白分泌的因素尚不明确。已经报道弓形虫的TgROP2可以插入纳虫泡膜并且介导纳虫泡锚定到宿主细胞线粒体周围^[29]。目前已被克隆、表达的新孢子虫的棒状体蛋白只有ROP2。Debache等^[30]将ROP2基因克隆到原核表达载体,获得重组蛋白recNcROP2。体外培养发现,抗recNcROP2抗体对速殖子侵入宿主细胞的抑制作用提高了70%,表明该蛋白参与侵入过程。随后他还证明NcROP2蛋白可以作为C57BL/6小鼠新孢子虫引起的脑病的候补疫苗。用不完全佐剂和肥皂精素分别乳化重组recNcROP2疫苗免疫C57BL/6小鼠,对照组分别用弗式不完全佐剂和肥皂精素免疫C57BL/6小鼠,免疫三次后,再给这些小鼠分别感染 2×10^6 速殖子,结果发现接种疫苗的小鼠无任何临床症状,未接种的小鼠有临床表现。感染小鼠35 d后,定量PCR检测所有小鼠的脑组织,结果显示用肥皂精素乳化重组体recNcROP2疫苗的小鼠脑组织中的虫体数比单独免疫肥皂精素的小鼠脑组织中的虫体减少93%;用不完全佐剂乳化重组体recNcROP2疫苗的小鼠脑组织中的虫体数比单独免疫不完全佐剂小鼠脑组织中的虫体数减少75%。ELISA检测免疫小鼠的抗体消长状况,结果发现与对照组小鼠相比,用肥皂精素佐剂乳化重组蛋白免疫的C57BL/6小鼠中,血清IgG1水平有所提高,而用弗式佐剂乳化重组蛋白免疫的C57BL/6小鼠血清中,检测到IgG2水平也有很大的提高。这表明NcROP2疫苗可以诱导机体产生Th-1或Th-2的免疫反应。Debache等^[31]也发现在7只实验小鼠中,用重组蛋白NcROP2/NcMIC1/NcMIC3以复合体的形式作为疫苗可以完全抑制小鼠感染新孢子虫,抑制率达到了100%。

2.4 致密颗粒抗原(dense granule antigens, GRAs)

目前已知的有五个致密颗粒蛋白,分别是NcGRA1、NcGRA2、NcGRA6(又名NcDG2)、NcGRA7(又名NcDG1或Nc-p33)和NcNTP(又名NTPase)^[32]。致密颗粒蛋白的排放发生在纳虫泡膜形成初期,它的排放途径至今未明。Vonlaufen

等^[33]电镜观察表明寄生虫位于由囊壁包围的纳虫泡内,致密颗粒蛋白NcGRA1、NcGRA2、NcGRA7嵌入囊壁中。Hemphill等^[12]证明虫体侵入宿主细胞后Nc-p33也锚定在纳虫泡膜,在感染后的每个阶段,都可以在纳虫泡中发现。这说明Nc-p33对纳虫泡及其膜的修饰起很大的作用。Nishikawa等^[34]将NcGRA7蛋白包埋于由甘露三糖包被的脂质体中,然后将其皮下免疫小鼠,结果显示NcGRA7的包埋体可以诱导小鼠产生寄生虫特异性T辅助型免疫反应和体液免疫。30 d后观察发现在小鼠怀孕前注射的,后代的生存率跟对照组小鼠相比提高了51.1%;PCR检测到注射NcGRA7包埋体的小鼠脑组织中DNA含量跟对照组相比降低了66.7%。另外,Ellis等^[35]发现NcGRA2在培养的速殖子里大量表达,并且NcGRA2和其他成分作为重组疫苗可以抵御强毒性速殖子的攻击。这些可以说明致密颗粒蛋白对纳虫泡具有修饰作用,并且可以作为疫苗降低新孢子虫的感染率。

2.5 蛋白酶的作用

虫体侵入宿主细胞需要蛋白质的参与,这些蛋白质的组合、转运、加工、水解等过程都离不开蛋白酶的作用。目前已知的可能与新孢子虫侵入有关的、由新孢子虫代谢分泌器官分泌的蛋白酶有:天冬氨酸蛋白酶Toxomepsin和丝氨酸蛋白酶NcSUB1。应用酶抑制剂所做的酶功能抑制试验,表明蛋白酶在此过程中发挥了重要作用,如天然的丝氨酸/异甲硫蛋白/半胱氨酸蛋白酶抑制剂对虫体黏着和侵入宿主细胞都没有影响;而天冬酰胺蛋白酶抑制剂对虫体侵入宿主细胞有很大的影响^[27]。2004年,Morris等^[36]研究发现新孢子虫可以表达单结构域的丝氨酸抑制剂,并且该蛋白集中在致密颗粒,并分泌到寄生泡内。它的作用有待进一步研究。蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)是一种丰富的氧化还原酶,催化蛋白质分子中巯基与二硫键的交换反应。它在通过转调二硫桥键使富含半胱氨酸蛋白的三维构像改变方面起重要作用。Naguleswaran等^[37]发现新孢子虫的PDI(NcPDI)主要存在于内质网,大部分靠近宿主细胞核膜、微线体、虫体细胞表面附近,而不存在于棒状体和致密颗粒中。Liao等^[38]研究证明,用PDI特异性抑制剂杆菌肽锌、tocinoic acid和NcPDI抗血清可以有效抑制新孢子虫的增长,抑制率随着它们各自浓度增加而增长。当抑制剂杆菌肽锌和tocinoic acid的浓度为2 mmol/L时,抑制率接近100%;而NcPDI

抗血清的浓度为10%时,抑制率超过了50%。这些现象表明NcPDI在寄生虫侵入宿主细胞过程中起很重要的作用。

3 结语

新孢子虫侵入宿主细胞,不是一个基因、一个蛋白质的功能,而是许多蛋白质分子、多个调控机制以及与宿主细胞内众多因子相互作用而完成的。目前,新孢子虫虫体侵入宿主细胞机制的研究仍有一些难题尚待解决。例如,将纳虫泡运输到体内的机制尚不清楚;与弓形虫在侵入方面起重要作用的蛋白质相比较,新孢子虫中发现的与侵入有关的蛋白质相对偏少,阻碍了新孢子虫侵入机制的进一步研究,也更加凸显了加强新孢子虫的功能基因筛选及研究的重要性,这将为新孢子虫侵入宿主细胞机制的研究和新孢子虫疫苗的研究带来很大的希望;弓形虫微线体蛋白有15种以上,在微线体蛋白分泌、运输和释放过程中,它们以复合体形式起作用。与弓形虫微线体蛋白相比,新孢子虫微线体蛋白是否以复合体的形式起作用仍还未知。利用基因敲除技术对新孢子虫侵入宿主细胞机制的研究还是空白;现有的研究大多数集中在入侵和毒力蛋白的发现,以及功能的初步验证上,只有少数深入到蛋白质对宿主细胞信号转导的调控。因此对其侵入机制的研究尚有大量的工作有待完成。新孢子虫速殖子的表膜蛋白中有许多糖基化蛋白,糖基化蛋白的免疫学研究是当今免疫学研究的热点问题之一,可以把新孢子虫作为一个很好的载体加以深入的研究。由于新孢子虫表面抗原在新孢子虫病免疫中的局限性,近年来对新孢子虫代谢分泌抗原在虫体免疫中的作用研究成为新孢子虫病免疫中的热点,而代谢分泌抗原由于制作简便,免疫效果明显,进一步得到重视。可以预见,新孢子虫代谢分泌抗原将在安全有效地新孢子虫疫苗研制中发挥作用。目前使用疫苗来预防牛的*N. caninum*引起流产的报道还没有出现,但是给实验鼠接种灭活的虫体或它们的其他产品后可以预防新孢子虫的感染。因此,如何在自然感染的奶牛上诱导免疫保护仍然是一个问题。

【参 考 文 献】

- [1] Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd*, 1984, 70(2): 271-4
- [2] Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, et al. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Med Assoc*, 1988, 193(10): 1259-63
- [3] Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 1988, 192(9): 1269-85
- [4] Gondim LF, McAllister MM, Pitt Wc, et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol*, 2004, 34(2): 159-61
- [5] Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol*, 2003, 41(1): 1-16
- [6] Gondim LF. *Neospora caninum* in wildlife. *Trends Parasitol*, 2006, 22(6): 247-52
- [7] Hemphill A, Gottstein B, Kaufmann H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitology*, 1996, 112 (Pt 2): 183-97
- [8] Keeley A, Soldati D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol*, 2004, 14(10): 528-32
- [9] Naguleswaran A, Cannas A, Keller N, et al. *Neospora caninum* microneme protein NcMIC3: secretion, subcellular localization, and functional involvement in host cell interaction. *Infect Immun*, 2001, 69(10): 6483-94
- [10] Hemphill A. Subcellular localization and functional characterization of Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Infect Immun*, 1996, 64(10): 4279-87
- [11] Sinai AP, Webster P, Joiner KA. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci*, 1997, 110(Pt 17): 2117-28
- [12] Hemphill A, Gajendran N, Sonda S, et al. Identification and characterisation of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol*, 1998, 28(3): 429-38
- [13] Mordue DG, Sibley LD. Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J Immunol*, 1997, 159(9): 4452-9
- [14] Mordue DG, Desai N, Dustin M, et al. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med*, 1999, 190(12): 1783-92
- [15] Zhang HS, Lee EG, Liao M, et al. Identification of ribosomal phosphoprotein P0 of *Neospora caninum* as a potential common vaccine candidate for the control of both neosporosis and toxoplasmosis. *Mol Biochem Parasitol*, 2007, 153(2): 141-8
- [16] Schares G, Rauser U, Sondgen P, et al. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. *Int J Parasitol*, 2000, 30(10): 1123-30
- [17] Sonda S, Fuch S, Hemphill A, et al. The major 36 kDa *Neospora caninum* tachyzoite surface protein is closely related to the major *Toxoplasma gondii* surface antigen. *Mol Biochem Parasitol*, 1998, 97(1-2): 97-108
- [18] Howe DK, Crawford AC, Sibley LD, et al. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*, 1998, 66(11): 5322-8

- [19] Haldorson GJ, Mathison BA, Yamane I, et al. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. *Int J Parasitol*, 2005, 35(13): 1407-15
- [20] Pinitkiatisakul S, Mattsson JG, Lunden A, et al. Immunisation of mice against neosporosis with recombinant NcSRS2 iscoms. *Vet Parasitol*, 2005, 129(1-2): 25-34
- [21] Cho JH, Chung WS, Kim TS, et al. Protective efficacy of vaccination with *Neospora caninum* multiple recombinant antigens against experimental *Neospora caninum* infection. *Korean J Parasitol*, 2005, 43(1): 19-25
- [22] Keller N, Naguleswaran A, Hemphill A, et al. Identification of a *Neospora caninum* microneme protein (NcMIC1) which interacts with sulfated host cell surface glycosaminoglycans. *Infect Immun*, 2002, 70(6): 3187-98
- [23] Lovett JL, Howe DK, Sibley LD. Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol*, 2000, 107(1): 33-43
- [24] Keller N, Naguleswaran A, Hemphill A, et al. Identification and characterization of a *Neospora caninum* microneme-associated protein (NcMIC4) that exhibits unique lactose-binding properties. *Infect Immun*, 2004, 72(8): 4791-800
- [25] Sonda S, Fuchs N, Hemphill A, et al. Molecular characterization of a novel microneme antigen in *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol*, 2000, 108(1): 39-51
- [26] Naguleswaran A, Cannas A, Hemphill A, et al. Vero cell surface proteoglycan interaction with the microneme protein NcMIC(3) mediates adhesion of *Neospora caninum* tachyzoites to host cells unlike that in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, 2002, 32(6): 695-704
- [27] Naguleswaran A, Muller N, Hemphill A. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite-host cell interactions. *Exp Parasitol*, 2003, 104(3-4): 149-58
- [28] Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop*, 2002, 81(2): 111-22
- [29] Sinai AP, Joiner KA. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol*, 2001, 154(1): 95-108
- [30] Debache K, Guionaud C, Hemphill A, et al. Vaccination of mice with recombinant NcROP2 antigen reduces mortality and cerebral infection in mice infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol*, 2008, 38(12): 1455-63
- [31] Debache K, Alaeddine F, Hemphill A, et al. Vaccination with recombinant NcROP2 combined with recombinant NcMIC1 and NcMIC3 reduces cerebral infection and vertical transmission in mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol*, 2009, 39(12): 1373-84
- [32] Asai T, Howe DK, Sibley LD, et al. *Neospora caninum* tachyzoites express a potent type-I nucleoside triphosphate hydrolase. *Exp Parasitol*, 1998, 90(3): 277-85
- [33] Vonlaufen N, Guetg N, Naguleswaran A, et al. *In vitro* induction of *Neospora caninum* bradyzoites in vero cells reveals differential antigen expression, localization, and host-cell recognition of tachyzoites and bradyzoites. *Infect Immun*, 2004, 72(1): 576-83
- [34] Nishikawa Y, Zhang H, Ikehara Y, et al. Immunization with oligomannose-coated liposome-entrapped dense granule protein 7 protects dams and offspring from *Neospora caninum* infection in mice. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16(6): 792-7
- [35] Ellis JT, Ryce C, Harper PA, et al. Isolation, characterization and expression of a GRA2 homologue from *Neospora caninum*. *Parasitology*, 2000, 120(4): 383-90
- [36] Morris MT, Cheng WC, Carruthers VB, et al. *Neospora caninum* expresses an unusual single-domain Kazal protease inhibitor that is discharged into the parasitophorous vacuole. *Int J Parasitol*, 2004, 34(6): 693-701
- [37] Naguleswaran A, Alaeddine F, Hemphill A, et al. *Neospora caninum* protein disulfide isomerase is involved in tachyzoite-host cell interaction. *Int J Parasitol*, 2005, 35(13): 1459-72
- [38] Liao M, Ma L, Bannai H, et al. Identification of a protein disulfide isomerase of *Neospora caninum* in excretory-secretory products and its IgA binding and enzymatic activities. *Vet Parasitol*, 2006, 139(1-3): 47-56