



Research  
Animal Disease Research—Review

## 新孢子虫病——分子流行病学及发病机制综述

Asis Khan<sup>a,\*</sup>, Jahangheer S. Shaik<sup>a</sup>, Patricia Sikorski<sup>a</sup>, Jitender P. Dubey<sup>b</sup>, Michael E. Grigg<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Molecular Parasitology Section, Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

<sup>b</sup> Animal Parasitic Disease Laboratory, Beltsville Agricultural Research Center, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Beltsville, MD 20705, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 September 2018

Revised 12 February 2019

Accepted 22 February 2019

Available online 7 August 2019

#### 关键词

新孢子虫病  
分子流行病学  
群体遗传学  
基因组学  
宿主反应  
疫苗

### 摘要

犬新孢子虫 (*Neospora caninum*) 是一种囊肿形成的原生动植物寄生虫, 它是世界范围内牛的流产和新生儿死亡的主要原因。犬新孢子虫具有广泛的中间宿主范围, 其有性繁殖只在犬科动物中发生。另一种新孢子虫——休斯新孢子虫也已经被发现, 它能导致马的脑髓炎。虽然分子流行病学研究尚处于起步阶段, 但核糖体小亚单位RNA (small subunit ribosomal RNA, ssuRNA) 和犬新孢子虫物种特异性DNA探针 (pNc5) 中的18S rRNA和ITS1区域已被广泛应用于区分新孢子虫和其他密切相关的顶复门寄生虫。虽然这些重复区域比管家或抗原基因具有更高的敏感性和特异性, 但它们具有较低的区别能力, 无法捕捉物种内部的多样性。同样, 尽管多个小卫星或微卫星标记研究显示了新孢子虫体内清晰的地理亚结构, 但由于不同等位基因的大小在微卫星位点上趋同 (称为同形质), 虫株往往被错误分类。只有一株名为 *N. caninum* Liverpool (Nc-Liv) 的虫株被进行基因组测序, 并与其近亲弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 进行了比较。因此, 需要基于全世界多个虫株的全基因组序列进行详细的群体基因组学研究, 以便更好地了解新孢子虫目前的种群遗传结构, 最终确定能够更有效对抗牛新孢子虫病的疫苗候选者。本文的目的是概述我们目前对新孢子虫的分子流行病学和基因组学的理解, 并将其与密切相关的顶复门寄生虫哈蒙球虫和弓形虫结合起来。

© 2019 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 历史回顾

犬新孢子虫 (*N. caninum*) 是一种球虫原虫, 属于顶复门[1], 1988年以前人们常将其与密切相关的顶复门寄生虫弓形虫 (*T. gondii*) 混淆[2,3]。1984年, Bjerkås等[4]首次描述了挪威的一窝6只拳师犬幼犬先天性感染的脑脊髓炎 (脑和脊髓疾病) 和肌炎 (肌肉疾病) 病例, 这是由某一不明寄生虫导致的。这种寄生虫于1988年被正式确认为犬新孢子虫, 其依据是对美国

波士顿安格尔纪念动物医院 (Angell Memorial Animal Hospital) 对1952—1987年死于弓形虫样疾病的狗和猫的数千个组织切片进行回顾性分析, 该组织切片对抗弓形虫抗体的免疫组织化学反应呈阴性[2,3]。

## 2. 生活史

犬新孢子虫寄主范围很广, 且拥有一个由两种不同的繁殖方式组成的多宿主的生活史: ①无性繁殖, 发生

\* Corresponding author.

E-mail address: [asis.khan@nih.gov](mailto:asis.khan@nih.gov) (A. Khan).

在中间寄主中；②有性繁殖，仅发生在终末宿主犬中，包括狗[5]、郊狼[6]、灰狼[7]和野狗[8]（图1）。虽然弓形虫的有性繁殖阶段已经十分明确，但犬新孢子虫的有性繁殖阶段尚不清楚，如裂体增殖和配子生殖。犬新孢子虫唯一已知的性阶段是非孢子化二倍体卵囊，它对冷冻和干燥具有环境抵抗力。未孢子化的卵囊从受感染的犬的粪便中脱落，并在环境中进行减数分裂，形成单倍体孢子（图1）[3]。在中间宿主摄入孢子化卵囊之后，孢子体从卵囊中释放出来，并转化为一个迅速生长的阶段（称为速殖子），从而传播感染（图1）。在纳虫空泡（parasitophorous vacuole, PV）内，速殖子侵入宿主细胞，通过重复的内生性复制无性繁殖。经过几轮的胞内增殖后，寄生虫溢出宿主细胞[9]重新感染新的宿主细胞，随后产生宿主特异性的先天和适应性免疫反应。由于宿主的免疫反应和其他环境因素，速殖子转化为一个缓慢生长的半休眠阶段（称为缓殖子），并存在于组织包囊中（图1）。组织包囊可以在宿主细胞中长期存在，并且可以转化为速殖子以产生慢性感染，特别是

针对免疫功能低下的宿主[10]。

### 3. 传染

尽管具有广泛的宿主范围和复杂的生活史，但新孢子虫分别感染牛和狗作为其主要中间宿主和终宿主[11]。牛可以通过摄入由终宿主排出的感染性卵囊横向传染，也可以经胎盘或先天性传播从一个受感染的怀孕母亲向它的胎儿垂直传播（图1）。垂直传播被认为是新孢子虫在牛群中最主要和最有效（80%）的传播途径。垂直传播既可以通过妊娠母牛的卵囊源性感染进行外源性传播，也可以通过妊娠期间重新激活的慢性感染进行内源性经胎盘传播[3]。感染新孢子虫的胎儿可以在任何胎龄内流产，被吸收，木乃伊化，自体溶解，或出生后持续感染。其他中间宿主包括绵羊、山羊、鹿和狗也有过经胎盘传播的记录。通过精液和牛奶传播被认为是不可能的[3]。狗通常通过摄入受感染的中间宿主组织而造成经口感染。猫是弓形虫和哈蒙球虫

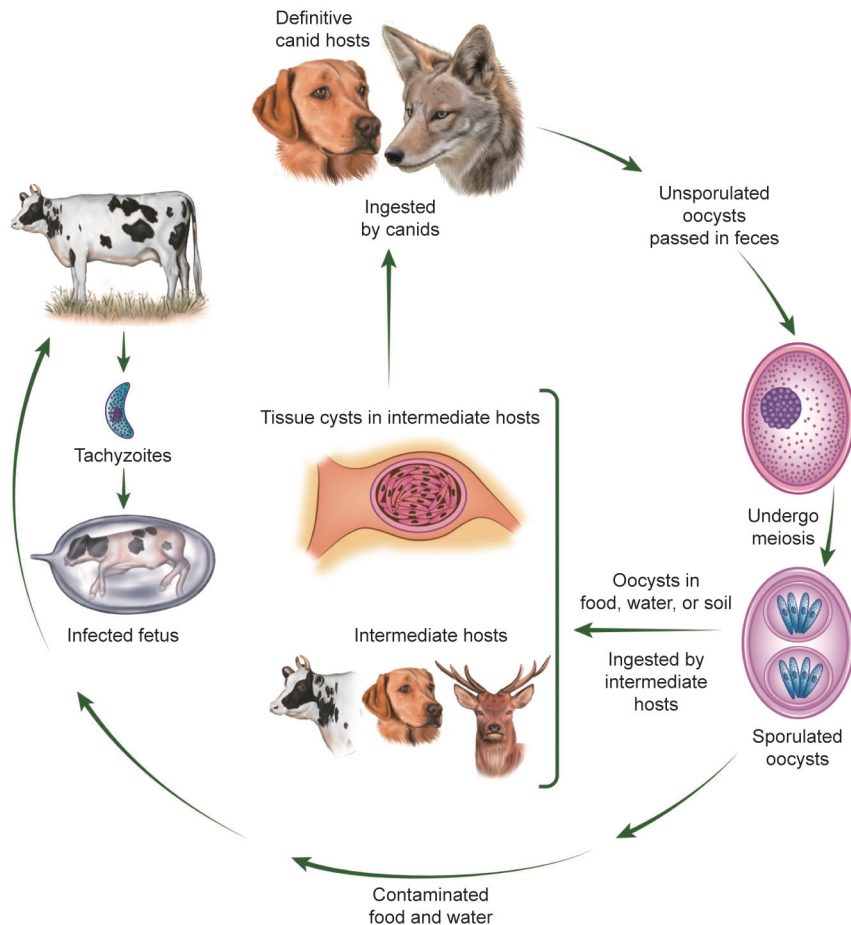


图1. 多宿主的新孢子虫生活史。转载自参考文献[3]。

(*Hammondia hammondi*) 的终末宿主[12]，与猫不同的是，狗在性传播过程中通常会产较少的新孢子虫卵囊。考虑到狗和牛在兽群中的密切联系[1,5]以及通过几代牛进行垂直传播的可能性[13,14]，传染的可能性明显更高，因为寄生虫可以在同一兽群内的终末宿主和中间宿主之间长期维持和繁殖。这种通过无性繁殖和有性生殖在牛和狗之间的局部传播周期可能正在塑造新孢子虫的种群结构。

## 4. 休斯新孢子虫

鉴定新的新孢子虫种（即休斯新孢子虫）的首次报道是在1998年，宿主是美国加利福尼亚州的一匹患有马原虫性脑脊髓炎的马。休斯新孢子虫被认为是一个分离出来的物种，因为它似乎仅限于马[15]，且与犬新孢子虫相比，有明显的抗原和序列差异。例如，表面抗原SAG1在NcSAG1与NhSAG1之间的氨基酸同源性差异为6% [16]。因此，NcSAG1衍生的mAb 6C11不与休斯新孢子虫SAG1杂交[16]。相似地，另一种表面抗原SRS2（NcSRS2和NhSRS2）表现出9%的氨基酸差异。因此，这两种表达丰富的表面抗原之间的抗原特异性已被用来产生有效的分子标记物，以区分犬新孢子虫和休斯新孢子虫[16]。休斯新孢子虫和犬新孢子虫之间的致密颗粒蛋白GRA6和GRA7的比较分析也揭示了氨基酸序列和结构组织的显著差异[18]。除了这些抗原标记物外，还使用了基于重复的ITS1区域内的核苷酸序列差异的敏感分子检测方法来区分休斯新孢子虫和犬新孢子虫（7~9 bp）[19]。

有趣的是，在实验性啮齿动物感染过程中，犬新孢子虫和休斯新孢子虫之间这些基因差异也会导致表型差异。休斯新孢子虫主要引起心肌组织坏死，而犬新孢子虫病主要见于肝脏、肺和大脑。此外，在沙鼠（*Meriones unguiculatus*）模型中，犬新孢子虫和休斯新孢子虫的致命性有显著差异。沙鼠极易受犬新孢子虫的经口感染，导致大多数沙鼠在感染后6~13 d内死亡[20]。相反，休斯新孢子虫感染在沙鼠中不会产生明显的临床症状，而只存在一些微小的病变。然而，这两个物种之间的遗传和生物学差异是否是由于物种特异性差异或虫株特异性差异（如弓形虫）引起的还需要进一步阐明。由于种间杂交最近已被证明发生在利什曼原虫领域，犬新孢子虫和休斯新孢子虫之间的实验性遗传杂交也许可以

揭示这两种寄生虫是否应该被认为是单独的物种[21]。综上所述，目前的共识是：新孢子虫种群结构至少由两个独立的新孢子虫种类组成，即犬新孢子虫和休斯新孢子虫，它们由一个共同的祖先进化而来，并且已经独立地扩展以适应它们的各种脊椎动物宿主。

## 5. 检测

### 5.1. 形态学检测

目前已经开发了几种形态学检测方法来识别感染样本中的新孢子虫病。细胞学通过显微镜检查细胞自旋涂片或印模涂片，其次是Diff-Quick快速染色，Giemsa染色和（或）苏木精或伊红（hematoxylin or eosin, HE）染色病变，是领域内快速检测新孢子虫病最常规的方法。然而，由于与密切相关的寄生虫在形态上的相似性，除了*Neospora*的标志之一厚壁（高达4  $\mu\text{m}$ ）组织包囊的存在外，很难将新孢子虫与弓形虫和哈蒙球虫区分开来。透射电子显微镜也被用来将新孢子虫与弓形虫和肉孢子虫进行区分，其基础是新孢子虫中存在电子密集的棒状体。相反，弓形虫具有低电子密度，而在肉孢子虫裂殖子中没有棒状体。免疫组织化学（immunohistochemical, IHC）染色是另一种检测固定组织中的新孢子虫病的方法，它敏感性强且被广泛使用[22–24]。亲和素-生物素复合物间接免疫过氧化物酶和过氧化物酶-抗过氧化物酶技术也是具有相同敏感性的方法。针对新孢子虫的单克隆抗体和多克隆抗体均被用于IHC，其中兔多克隆抗体比单克隆抗体具有更高的敏感性。然而，最近，NcSRS2和NcGRA7单克隆抗体[24]的组合被证明比多克隆抗体更特异、更敏感，从而抑制了多克隆抗体与弓形虫或相关球虫寄生虫交叉反应的可能性。

### 5.2. 血清学检测

自从发现新孢子虫病以来，已经开发了几种血清学方法来检测它。感染后，可在两周内检测到新孢子虫特异性免疫球蛋白M（immunoglobulin M, IgM）抗体，而IgG抗体需要几周时间才能达到检测水平，滴度在初次感染后6个月达到峰值。几种抗原已被广泛用于检测，包括表面抗原NcSRS2、NcSAG1、NcSAG4和Ncp40，细胞骨架蛋白NCPF，致密颗粒蛋白NcGRA2、NcGRA6和NcGRA7，丝氨酸蛋白酶NcSUB1以及微

线体蛋白NcMIC6和NcMIC10 [25]。间接荧光抗体试验 (indirect fluorescent antibody test, IFAT) 是应用于新孢子虫检测的第一种基于抗体的方法[2]。在这种方法中,完整的速殖子被固定在盖玻片上,并与试验血清一起孵育;然后它们与荧光素标记的针对宿主免疫球蛋白的二抗进行杂交。IFAT被认为是检测新孢子虫病的参考试验,因为该试验与密切相关的顶复门寄生虫的交叉反应性很小,可以通过滴度血清来量化[26,27]。通过使用新孢子虫特异性抗原[28,29]取代改良凝集试验(modified agglutination test, MAT)中的弓形虫抗原,一种直接的新孢子虫凝集试验(*Neospora* agglutination test, NAT)也得到了发展。NAT已被用来测试在多达16种不同动物物种的大量血清中是否存在IgM,并被发现与IFAT一样敏感。然而,最广泛和最商业化的血清学检测方法是酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) [30],它可对大量样品进行自动化扫描,具有较高的特异性。已经建立了各种ELISA方法,如间接ELISA法(iELISA)和细胞ELISA法(cELISA),主要采用速殖子总裂解或纯化的天然抗原进行聚苯板敏化作用[31,32]。利用天然或总抗原的一个缺点是可能与其他密切相关的球虫寄生虫发生交叉反应[33]。因此,广泛的新孢子虫特异性抗原目前被用于包被ELISA板,以建立特异性[30,34,35]。同时利用IgG、IgA和IgE抗体建立了基于ELISA的亲性和性试验,以估计感染的时机。其他血清学技术,如基于NcGRA6 [36]、NcSAG1 [37]的乳胶凝集试验(latex agglutination test, LAT)和免疫印迹实验(immunoblot, IB) [38]已经被开发出来,但没有得到广泛的应用。

## 6. 感染率

牛、肉牛、狗、山羊和其他家畜血清中新孢子虫抗体的存在已在世界各地报道过,主要使用上述血清学方法。牛、狗、山羊和绵羊的血清感染率如图2所示[3]。然而,值得一提的是,由于使用血清学方法的不同、临界值的差异以及缺乏从受感染动物中分离活寄生虫的验证,不同研究小组的血清感染率数据是不可比较的[1]。尽管如此,在其他研究中已经成功地从确定的宿主中分离出了可存活的寄生虫,特别是狗,以及广泛的中间宿主,如牛、羊、白尾鹿和水牛[1,3]。虽然实验表明新孢子虫在养牛业中只在牛和狗之间传播,但上述任何中间宿主都可能作为新孢子虫传播的额外重要宿主而存在。

例如,白尾鹿是美国新孢子虫的主要宿主之一,其血清阳性率为88% [39]。人畜共患病传播的可能性也是未知的。有人认为,与弓形虫不同,新孢子虫和哈蒙球虫对人类没有传染性。巴西、丹麦、埃及、韩国和美国的人体内都检测到了低滴度的新孢子虫抗体[40–42]。虽然这一观察结果可以用弓形虫和新孢子虫的抗原相似性来解释,但在灵长类动物(*Macaca mulatta*)模型中已经通过实验描述了经过胎盘传播的新孢子虫病[43,44],新孢子虫可以在不同的人类细胞系中进行体外培养[45]。因此,这些数据提供了有关人畜共患疾病传播可能性的线索。然而,尚未从人身上回收到活的寄生虫或寄生虫的DNA。



图2. 牛、狗、山羊和绵羊等(x轴)不同宿主的新孢子虫的总体血清阳性率的热图。y轴代表国家/地区。

## 7. 分子流行病学

新孢子虫领域成功的分子流行病学和系统发育研究需要从其广泛的宿主和地理范围中分离出大量虫株以及合适的遗传工具。与弓形虫不同，新孢子虫研究缺乏足够的工具和分离虫株以区分不同的新孢子虫虫株及其宿主限制机制。迄今为止，新孢子虫虫株的鉴定依赖于一些测序标记，这些标记已用于将新孢子虫与密切相关的球虫区分开来。但是，这些标记不能区分不同的新孢子虫虫株。新孢子虫中使用最广泛的分子标记是 *ssuRNA* 和 *pNc5* (GenBank 登录号: X84238) 中的 18S *rRNA* 和 ITS1 区域[43,44]，因为它们具有重复的特性，单拷贝基因对聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测的敏感性低于多拷贝基因。在弓形虫、哈蒙球虫和新孢子虫之间的 18S *rRNA* 基因中，仅检测到少量的单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphism, SNP)，说明它们之间存在密切的关系。然而，利用通用引物、物种特异性化学发光 DNA 杂交探针[46]、使用新孢子虫特异性引物进行的第二轮巢式 PCR [47] 或 PCR 限制性片段长度多态性 (PCR-restricted fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 与 *Bsa*JI 酶[48]，这些 SNP 足以将新孢子虫与弓形虫和哈蒙球虫区分开来。尽管可以利用 18S *rRNA* 区分亲缘关系较近的寄生虫，但目前尚未发现 NC1、*N. caninum* Liverpool (Nc-Liv)、NC3、NC-SweB1 等不同新孢子虫分离株之间的序列差异[43,44]。另一个 *ssuRNA* 标记 ITS1 由于其高灵敏度和特异性也被广泛用于物种特异性区分。随后，为了提高检测新孢子虫 1~10 fg 基因组 DNA 的敏感性，设计了一种基于 ITS1 的单管嵌套式 PCR [49]。该方法具有较高的灵敏度和特异性。但是，与 18S *rRNA* 位点不同，在 NC-Bahia 虫株 (南美起源) 和新孢子虫的不同犬和牛分离株之间发现了差异，包括 NC1、Nc-Liv、BPA1、NC-SweB1 和 NcNZ1，它们在 ITS1 上共享相同的序列[15,44,50,51]。尽管后一种标记对于检测新孢子虫极为敏感，但由于在循环新孢子虫分离物中发现了高度的遗传相似性，因此可能不适用于表征种内虫株异质性或系统发育分析。另一个多拷贝基因 *pNc5* 已被广泛用于检测广泛的中间宿主和最终宿主中的新孢子虫感染。然而，由于这些引物被报道可以扩增啮齿类动物特异性 DNA，因此它的特异性并不强[52]。最近，基于单基因测序的标记包括 14-3-3、表面抗原 (SAG1、SAG4 和 SRS2)、分泌的致密颗粒蛋白 (GRA6 和 GRA7) 以及一些管家基因，如  $\alpha$ -微管

蛋白、 $\beta$ -微管蛋白和热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP-70) 被开发用于对来自某一特定地理区域的一些牛和犬新孢子虫分离株进行基因分型[16–18,53,54]。这些标记在不同的新孢子虫分离株中高度保守，这使得它们在鉴别新孢子虫分离株中的有效性受到质疑。

与单拷贝基因序列标记不同，小卫星或微卫星标记被分类为可变数目的串联重复序列 (variable number of tandem repeat, VNTR) DNA，在该物种的不同分离株之间捕获了广泛的遗传多样性。因此，小卫星和微卫星标记已被广泛用于密切相关的新孢子虫分离株的分子区分[55, 56]。一项使用微卫星标记的基因分型研究确定了 9 种新孢子虫之间的遗传多样性，而每种病原菌的 DNA 谱与其地理起源之间没有关联[55]。在另一项最新研究中，使用 9 种多位点微卫星标记对来自世界各地的 11 株新孢子虫参考虫株和来自西班牙、阿根廷、苏格兰和德国的 96 株新孢子虫临床虫株进行了基因分型[57]。微卫星表征揭示了广泛的遗传多样性，其中包括 96 个微卫星多位点基因型。微卫星标记不能捕获整个基因组的真实多态性，并且可能由于相似性而将虫株误分类为变异体[58]。然而，基于 *F* 统计值 (*F*-statistics value,  $F_{ST}$ ) 和 eBURST 分析，使用这些标记物可以识别出清晰的地理亚结构，这可能表明随着畜牧业的发展，出现了新孢子虫分离株[57]。因此，需要进行系统分析，将相对非多态性的单基因位点与使用微卫星标记鉴定的遗传多样性进行比较，以确定种群遗传多样性的真实程度。最近，宏基因组新一代测序 (next-generation sequencing, NGS) 已发展成为研究弓形虫性脑炎的诊断工具[59]。因此，可以开发宏基因组新一代测序，以与新孢子虫病病例有因果关系的靶标独立方式鉴定和基因分型。

## 8. 基因组

尽管弓形虫、哈蒙球虫和新孢子虫在宿主范围和其他生物学方面 (如小鼠模型中的毒力) 存在显著差异，但基于全基因组测序，它们的基因组具有高度同义性 [表 1、图 3 (a)] [60–62]。Nc-Liv 是第一个使用 Sanger 测序技术测序到 8 倍覆盖率的新孢子虫基因组。它聚集成一个由 585 个超级重叠群和 7121 个基因组成的 61 Mb 基因组 (欧洲核苷酸档案库，项目: CADU00000000; www.toxodb.org)。随后，由于它们的高同义基因组，使用弓形虫 Me49 基因组将这些超级重叠群重新组装成 14 条染色体 [图 3 (a)] [60,61]。尽管大约在 2800 万年前

新孢子虫和弓形虫从它们的共同祖先中被分离出来，但根据恶性疟原虫和赖氏疟原虫之间的突变率计算得出的结果[63]，在这两种疟原虫之间只观察到少量的染色体重排和较低的遗传信息净增益/损失物种。一个例外是新孢子虫（227 *NcSRS*基因和52 *NcSRS*假基因）中的表面抗原家族[尤其是SAG1相关序列（SAG1-related sequence, SRS）]的显著扩展，它们串联排列在整个基因组的多基因簇中[图3（b）]。在这些SRS中，新孢子虫在速殖子阶段仅表达25个*NcSRS*基因的一个子集，每个多基因簇仅表达一个基因。基于Nc-Liv的速殖子以及基于链特异性RNA测序和鸟枪法蛋白质组学，已校正了超过1/3先前注释的基因模型和未翻译区（untranslated region, UTR）的最新预测遗传结构[64]。RNAseq数据的使用不仅显著提高了新孢子虫基因组的注释质量，而且还导致了顺式-天然反义转录本（cis-natural anti-

sense transcript, cis-NAT）和长基因间非编码RNA（long intergenic non-coding RNA, lincRNA）的鉴定[64]。有趣的是，对弓形虫、哈蒙球虫和新孢子虫之间代谢途径的比较分析发现，除了少数差异表达的基因和犬新孢子虫中氮代谢基因的上调外，新陈代谢基因没有重大变化[61]。

## 9. 分子遗传学工具

全基因组测序和转录分析的出现促进了分子遗传学工具的发展，以阐明新孢子虫基因调控和发病机制的潜在机制。然而，为了阐明已经通过基因组学研究鉴定的基因的功能，有必要开发操纵基因组的遗传工具。由于与弓形虫基因组高度同源[60,61]，现有的用于弓形虫遗传修饰的异源表达系统已初步用于新孢子虫的转染和转

表1 三种紧密相关的顶复门寄生虫的比较分析

Feature	<i>N. caninum</i>	<i>H. hammondi</i>	<i>T. gondii</i>
Definitive hosts	Canids	Felids	Felids
Intermediate hosts	Bovids, horses	Rodents	Mammals, birds
Human infection	Unlikely	Unlikely	Yes
Estimated size (Mb)	62	65	65
Assembly length without sequencing gaps (bp)	57 524 119	67 460 985	65 464 221
Number of chromosomes	14	14	14
Number of protein-coding genes	6936	8004	8322
GC content (%)	54.8	52.5	52.2
Average length of protein-coding genes (bp)	4892	4868	4778

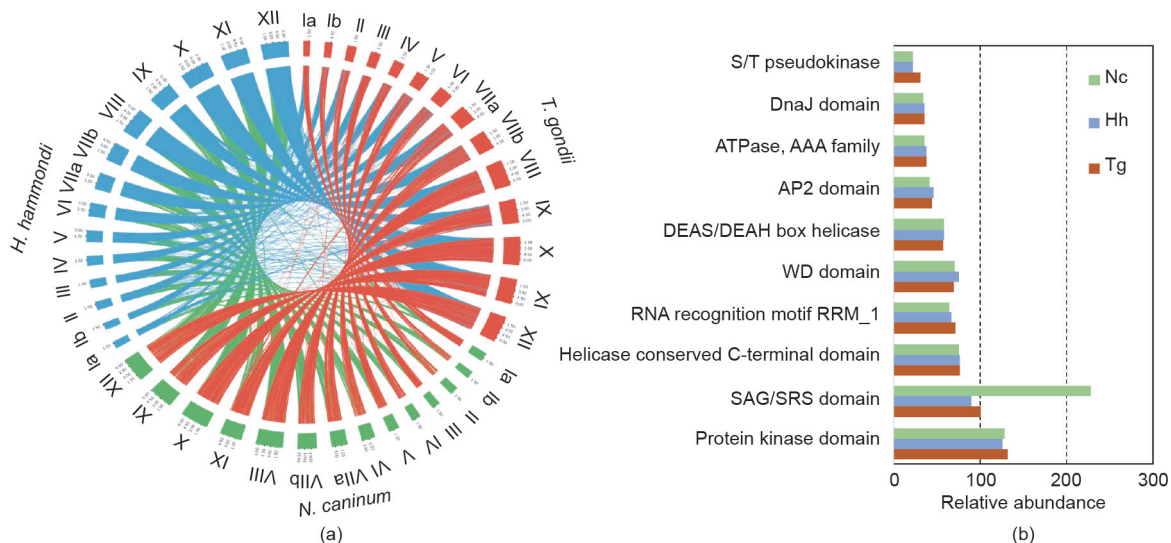


图3. 紧密相关的顶复门寄生虫新孢子虫、弓形虫和哈蒙球虫的比较分析。(a) Circos图表明三个紧密相关的顶复门寄生虫之间的高度同基因组的基因组。外圈代表每个寄生虫的带注释的染色体。使用NCBI blast V. 2.5在这些虫株的参考序列（www.toxodb.org）中进行核苷酸比对。允许同一性为70%或更高， $e$ 值小于0.001，最小片段大小为500 bp。使用Circos V. 0.69中的功能区链接，绘制了由核苷酸母带发现的参考序列之间的同构关系。(b) 新孢子虫（Nc）和哈蒙球虫（Hh）中的弓形虫Me49（Tg）的前10个Pfam结构域的相对丰度表明，新孢子虫中SAG/SRS结构域的显著扩展。

化[65]。利用弓形虫GRA1启动子，大肠杆菌*lacZ*基因也在新孢子虫中稳定表达[66]，这一转基因株成为筛选抗寄生虫分子的重要工具。随后，弓形虫的几个基因，包括SAG1、GRA2、NTPase3和ROP2，也被成功转染到新孢子虫中，以更好地了解这些基因的分子机制。这项工作最终使ROP8基因得到鉴定。因此，弓形虫基因在免疫学上不同的新孢子虫背景中的异源表达[67]证明了研究重要的弓形虫基因对活疫苗候选物开发的有用性[68]。继成功的稳定转染系统后，突变的二氢叶酸还原酶-胸苷酸合酶（dihydrofolate reductase-thymidylate synthase, DHFR-TS）对乙胺嘧啶有抗性[69]，并插入了稳定的药物选择标记，如氯霉素乙酰基转移酶[70]，来研究新孢子虫中的基因组编辑。最近，刚地弓形虫的簇状规则间隔的短回文重复序列（clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR）相关基因9（CRISPR/Cas9）系统已被有效地和专门地用于新孢子虫的基因组编辑[71]。利用CRISPR/Cas9系统，已成功地从Nc-1表达绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）的虫株和Nc-Spain7分离物的NcGRA7基因中删除GFP，并用乙胺嘧啶选择标记取代[71]。因此，CRISPR/Cas9系统将提供有效和可靠的方法，对新孢子虫的基因组进行精确的、有针对性的改变，以研究特定的基因功能[72]，检测与新孢子虫发病机制有关的基因或产生能够对急性和慢性新孢子虫病提供免疫保护的减毒活疫苗株。

## 10. 病原与宿主的相互作用

在进化的过程中，宿主发展出复杂的免疫防御系统来对抗病原体，然而病原体已经进化出逃避宿主监测并成功感染的策略。新孢子虫感染大量的中间宿主。因此，能够进入宿主细胞并逃避宿主免疫力对其生存和持续感染至关重要。为了进入宿主细胞，新孢子虫首先在速殖子和宿主细胞表面之间形成低亲和力接触，然后黏附到宿主细胞上。宿主细胞表面蛋白聚糖，特别是速殖子的硫酸软骨素糖胺聚糖（glycosaminoglycan, GAG）和缓殖子的末端唾液酸残基，充当促进新孢子虫感染的黏附受体[73,74]。新孢子虫表面抗原，包括NcSAG1和NcSRS2，是促进宿主与寄生虫之间初始接触的寄生虫因子。有趣的是，全基因组测序结果发现，与亲缘关系最近的弓形虫（135个SRS基因）相比，新孢子虫[223个SRS基因，图3（b）]的表面抗原显著扩增[61]。

SRS基因扩增的显著差异和SRS基因对初始宿主免疫调节和寄生虫毒力调节的影响差异仍然未知。在初次接触后，寄生虫利用活跃的滑行运动和存在于分泌细胞器中持续表达的蛋白质[即微线体（microneme, MIC）、棒状体（rhoptry protein, ROP）和致密颗粒（GRA）]，通过移动连接进入宿主细胞，形成PV [75-77]。与刚地弓形虫中的机制不同，新孢子虫中天冬氨酰蛋白酶的抑制剂胃蛋白酶抑制剂在组装、运输微线体和棒状蛋白到宿主细胞中起着重要作用，并且对新孢子虫侵入有重要影响[77,78]。用兔抗N54进行的免疫荧光研究鉴定了另一种新孢子虫蛋白酶NcSUB1（以前称为NC-p65）。NcSUB1位于新孢子虫的微线体细胞器中，并参与宿主细胞的入侵机制[79]。运动结合体的形成导致ROP蛋白注入PV中。在刚地弓形虫中进行的基于正向遗传学的研究、数量性状基因座（quantitative trait locus, QTL）分析和基于反向遗传学的基因敲除研究，确定了ROP18/ROP5复合物是实验室小鼠感染期间的主要毒力因子。ROP5蛋白与免疫相关的GTPase (immunity-related GTPase, IRG) 结合以阻止其低聚和激活反应，伴随着ROP18介导的IRG磷酸化[80-87]。最近的研究表明，ROP18/ROP5复合物还包括另一种对低聚IRG具有高度亲和度的棒状激酶ROP17 [88]。有趣的是，对ROP18序列的全基因组的比较表明，ROP18在新孢子虫中呈现假基因化，并且包含上游区域（upstream region, UPS）。上游区域存在于非毒性III型虫株中，但不存在于毒性I型和中等毒性II型刚地弓形虫虫株中[61,89]。然而，在新孢子虫（Nc1）中表达刚地弓形虫I型RH毒株的ROP18增强了它们在小鼠中的毒性作用[90]。虽然ROP18在新孢子虫中呈假基因化，但已充分证明干扰素 $\gamma$ （interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ）是抵抗新孢子虫的主要细胞因子[91,92]。有趣的是，IFN- $\gamma$ 激活的间充质基质细胞不仅抑制了新孢子虫的生长，而且还显示了IRG（*irga6*、*irgb6*和*iRGD*）和鸟苷酸结合蛋白（*mGBP1*和*mGBP2*）对新孢子虫的抵抗作用[93]。因此，综上所述，这些发现表明，在实验小鼠模型中，假基因化的ROP18和参与寄生虫清除的IRG是导致新孢子虫的非毒性表型的原因。除了IFN- $\gamma$ 以外，新孢子虫还是toll样受体（toll-like receptor, TLR3）依赖性I型（ $\alpha/\beta$ ）干扰素的有效激活剂[94]。在刚地弓形虫的正向遗传学研究中，研究人员还发现了一种非ROP2棒状体蛋白ROP16。ROP16通过虫株特异性方式运输到宿主细胞核并磷酸化STAT3/STAT6，从而导致先天免疫信号的显著激活并通过减弱IL-12信号抑制小鼠体内的

毒力[61,95,96]。与刚地弓形虫相反,新孢子虫ROP16仅磷酸化STAT3,而不磷酸化STAT6,从而导致宿主细胞有凋亡趋势[97]。棒状蛋白质组分析已经在新孢子虫中发现其他棒状蛋白质成分,包括NcROP1、NcROP5和NcROP30,它们与弓形虫中的同源性很高。

类似地,在弓形虫入侵期间,致密颗粒抗原(GRA)被大量分泌出来,并在PV中组成性表达,以调节宿主信号通路。虽然一些GRA物质已被鉴定为弓形虫PV成熟的关键调节剂[98],但其中与宿主细胞核相关的屈指可数:仅有GRA15 [99]、GRA16 [100]和GRA24 [101]。GRA15已被证明可激活NF- $\kappa$ B通路,并控制感染后刚地弓形虫的IL-12分泌的诱导[99]。相反,GRA16参与细胞周期进程和p53肿瘤抑制途径[100],而GRA24调节宿主p38 $\alpha$  MAP激酶[101]。与刚地弓形虫的情况相反,除了NcGRA6和NcGRA7(原名NcDG1 [102]和NcDG2 [103]),GRA在新孢子虫中的特征不明显。NcGRA7被分泌到PV中,并且位于PV基质(PV matrix, PVM)中[76]。包括NcGRA1、NcGRA2、NcMAG1和NcNTPase在内的其他GRA已被表征并在速殖子致密颗粒中表达,并位于PV基质中[76,104]。虽然GRA15激活了刚地弓形虫中的NF- $\kappa$ B通路[99],但该基因在新孢子虫中呈假基因化。

在实验小鼠模型中,多种差异性和虫株特异性分泌效应因子对刚地弓形虫与宿主的相互作用和毒力产生了影响。虽然新孢子虫的特异虫株差异还没有得到很好的研究,但已经有文献记载了几个不同免疫结果的实例。一个例子是,与无毒的Nc-SweB1分离株相比,对照株Nc-Liv被证明可在小鼠中引起严重的新孢子虫病临床症状,包括炎性浸润和高度坏死病变[105]。另一种非毒性分离虫株Nc-Nowra在实验室小鼠中引起轻度至中度非化脓性脑炎,而Nc-Liv则引起严重非化脓性脑炎[106]。实验室小鼠毒力分析还显示NC1的毒性比NC3更强[107]。基于这些观察推测出,与刚地弓形虫相似,毒力的差异是由于新孢子虫虫株特异性差异造成的。为了支持这一假设,研究人员进行了比较差异凝胶电泳(difference gel electrophoresis, DIGE)和基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)技术。结果表明,蛋白质组表达谱在强毒株和弱毒株之间存在显著差异。此外,这些分析还发现了NT-Pase在强毒新孢子虫虫株中的表达不受调控[108]。最近的一项新孢子虫免疫组学研究显示,强毒虫株(Nc-Liv,

Nc-Spain1H)和弱毒虫株(Nc-Spain7)之间存在虫株特异性差异。结果还显示出在强毒的虫株中,有4种蛋白质的表达始终较高:丝氨酸-苏氨酸磷酸酶2C、超氧化物歧化酶、GAP45和NcGRA1 [109]。与对刚地弓形虫的研究同理,正向遗传分析包括遗传杂交的发展以及随后的QTL分析或全基因组关联测试,可能会鉴定出导致新孢子虫致病机制中虫株特异性差异的其他分泌决定因素。

## 11. 疫苗接种

牛新孢子虫病造成的巨大经济损失受到了全世界的广泛关注。根据系统性的评估,全世界牛新孢子虫病造成的经济损失估计为 $1.298 \times 10^9$  USD $\cdot$ a $^{-1}$ ,最高可达 $2.380 \times 10^9$  USD $\cdot$ a $^{-1}$  [110]。这些损失的2/3来自于乳业( $8.429 \times 10^8$  USD $\cdot$ a $^{-1}$ ),因为奶牛受到新孢子虫感染而发生中位特异性流产的风险(14.3%)比肉牛(9.1%)更高。此外,全球2/3的经济损失发生在北美洲(65.7%),其次是南美洲(18.5%)和大洋洲(10.6%),而欧洲三个国家(荷兰、西班牙和英国)的损失估计仅为5.3%。因此,巴西、墨西哥和美国是接种新孢子虫疫苗的主要目标市场[110]。虽然牛新孢子虫病疫苗的全球市场很大,但是目前还没有预防会引发流产的新孢子虫病的传播的治疗方法或疫苗。唯一获得许可的犬新孢子虫疫苗是Bovilis Neoguard (Intervet International B.V., 荷兰)。它是由灭活的犬新孢子虫速殖子(收获时速殖子数为 $3 \times 10^6$ 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ )、10%的卤素佐剂、5%的稳定剂和5%磷酸盐缓冲盐水组成。不幸的是,在哥斯达黎加和新西兰进行的几项后续研究表明,这种疫苗或者药效低(20%),或者经胎盘传播增加导致胚胎早期死亡的风险增加,最终这种疫苗退出市场[72,111]。近来,弓形虫速殖子提取物疫苗与大豆卵磷脂/ $\beta$ -葡聚糖佐剂(sNcAg/AVEC)的可溶部分在孕牛中显示出免疫原性并诱导出高IFN- $\gamma$ 反应[112]。然而,由自然减毒或低毒力分离株(如Nc-Nowra [113]、Nc-Spain1H [114]和阿根廷分离株Nc-6 [115])组成的新孢子虫速殖子活疫苗可显著提高犬新孢子虫的抗体反应,并大大降低流产率。但是,使用活疫苗存在一些固有的弊端,如活寄生虫的大量保存问题以及免疫后病原性的逆转风险[116]。因此,灭活或亚单位疫苗是更有吸引力的选择。遗憾的是,被低聚甘露糖微粒体(M3-NcGRA7)包裹的NcGRA7重组



体(50~200 µg) [117], 以及细菌表达和纯化的重组蛋白, 包括rNcSAG1、rNcHSP20和rNcGRA7 [118], 都未能防止怀孕的母牛受到感染。因此, 研发一种新的、更有效的疫苗, 如新孢子虫的减毒活株(包括Ca<sup>2+</sup>依赖性蛋白激酶2缺陷速殖子), 对宿主长期免疫新孢子虫病至关重要[119]。

## 12. 结论

顶复门犬新孢子虫是导致牛流产、死胎或犬类神经肌肉障碍的主要原因。牛新孢子虫病对肉制品和乳品行业有巨大的经济影响, 且目前尚无有效的防治方法。因此, 研发出新药物、疫苗和(或)工具来对抗新孢子虫病极为迫切。为了研发出减轻新孢子虫病侵害的新方法, 有必要确定其种群遗传结构以预测病原体的进化过程, 还需要更好地了解宿主与病原体的相互作用。目前可用的遗传标记(基于RFLP和基于序列的标记)还不能完全区分犬新孢子虫分离株。近来, 微卫星标记可以在新孢子虫种群中鉴定出亚结构。然而, 利用微卫星标记确定的固定( $F_{ST}$ )统计数据 and Bayesian 聚类算法被同源异型推翻。同源异型推断出的种群结构比可能存在的更为复杂。因此, 对全世界范围内宿主的多种虫株进行全基因组测序是有必要的。这将扩大现存遗传标记的适用范围, 并能生产出更好的模型, 来确定通过无性繁殖或有性繁殖传播的程度, 以便制定出更明智的策略, 降低传播风险并提高宿主对新孢子虫急性和慢性感染的免疫保护。

## Acknowledgements

The authors are supported by the Intramural Research Program of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) at the National Institutes of Health. M.E.G. is a scholar of the Canadian Institute for Advanced Research (CIFAR) Program for Integrated Microbial Biodiversity.

## Compliance with ethics guidelines

Asis Khan, Jahangheer S. Shaik, Patricia Sikorski, Jitender P. Dubey, and Michael E. Grigg declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## References

- [1] Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev 2007;20(2):323–67.
- [2] Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ. 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, Hemphill A, Calero-Bernal R, Schares G. Neosporosis in animals. Boca Raton: CRC Press; 2017.
- [4] Bjerkås I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z Parasitenkd 1984;70(2):271–4.
- [5] McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 1998;28(9):1473–9.
- [6] Gondim LF, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 2004;34(2):159–61.
- [7] Dubey JP, Jenkins MC, Rajendran C, Miska K, Ferreira LR, Martins J, et al. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. Vet Parasitol 2011;181(2–4):382–7.
- [8] King JS, Slapeta J, Jenkins DJ, Al-Qassab SE, Ellis JT, Windsor PA. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 2010;40(8):945–50.
- [9] Ojo KK, Reid MC, Kallur Siddaramaiah L, Müller J, Winzer P, Zhang Z, et al. *Neospora caninum* calcium-dependent protein kinase 1 is an effective drug target for neosporosis therapy. PLoS ONE 2014;9(3):e92929.
- [10] Dubey JP. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Vet Parasitol 1999;84(3–4):349–67.
- [11] Dubey JP. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. J Am Vet Med Assoc 1999;214(8):1160–3.
- [12] Dubey JP, Ferguson DJ. Life cycle of *Hammondia hammondi* (Apicomplexa: Sarcocystidae) in cats. J Eukaryot Microbiol 2015;62(3):346–52.
- [13] Pare J, Thurmond MC, Hietala SK. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfohd mortality. Can J Veter Res 1996;60:133–9.
- [14] Thurmond MC, Hietala SK. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. Am J Vet Res 1997;58(12):1381–5.
- [15] Marsh AE, Barr BC, Packham AE, Conrad PA. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). J Parasitol 1998;84(5):983–91.
- [16] Marsh AE, Howe DK, Wang G, Barr BC, Cannon N, Conrad PA. Differentiation of *Neospora hughesi* from *Neospora caninum* based on their immunodominant surface antigen, SAG1 and SRS2. Int J Parasitol 1999;29(10):1575–82.
- [17] Fernández-García A, Risco-Castillo V, Zaballos A, Alvarez-García G, Ortega-Mora LM. Identification and molecular cloning of the *Neospora caninum* SAG4 gene specifically expressed at bradyzoite stage. Mol Biochem Parasitol 2006;146(1):89–97.
- [18] Walsh CP, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Zajac AM, Jenkins MC, Lindsay DS. Molecular comparison of the dense granule proteins GRA6 and GRA7 of *Neospora hughesi* and *Neospora caninum*. Int J Parasitol 2001;31(3):253–8.
- [19] Dubey JP, Liddell S, Mattson D, Speer CA, Howe DK, Jenkins MC. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. J Parasitol 2001;87(2):345–53.
- [20] Dubey JP, Lindsay DS. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. Parasitol Res 2000;86(2):165–8.
- [21] Romano A, Inbar E, Debrabant A, Charmoy M, Lawyer P, Ribeiro-Gomes F, et al. Cross-species genetic exchange between visceral and cutaneous strains of *Leishmania* in the sand fly vector. Proc Natl Acad Sci USA 2014;111(47):16808–13.
- [22] Cole RA, Lindsay DS, Dubey JP, Toivio-Kinnucan MA, Blagburn BL. Characterization of a murine monoclonal antibody generated against *Neospora caninum* tachyzoites by use of western blot analysis and immunoelectron microscopy. Am J Vet Res 1994;55(12):1717–22.
- [23] Lindsay DS, Dubey JP. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. Am J Vet Res 1989;50(11):1981–3.
- [24] Uzêda RS, Schares G, Ortega-Mora LM, Madruga CR, Aguado-Martinez A, Corbellini LG, et al. Combination of monoclonal antibodies improves immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum*. Vet Parasitol 2013;197(3–4):477–86.
- [25] McGiff JC, Laniado-Schwartzman M. Arachidonic acid metabolites and blood pressure control. Clin Physiol Biochem 1988;6(3–4):179–87.
- [26] Trees AJ, Guy F, Tennant BJ, Balfour AH, Dubey JP. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. Vet Rec 1993;132(6):125–6.
- [27] Dubey JP, Lindsay DS, Adams DS, Gay JM, Baszler TV, Blagburn BL, et al. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. Am J Vet Res 1996;57(3):329–36.
- [28] Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA, Loomis EF, Rowe JD, Anderson ML, et al. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development,

- optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5(4):467-73.
- [29] Romand S, Thulliez P, Dubey JP. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol Res* 1997;84(1):50-3.
- [30] Sinnott FA, Monte LG, Collares TF, Silveira RM, Borsuk S. Review on the immunological and molecular diagnosis of neosporosis (years 2011-2016). *Vet Parasitol* 2017;239:19-25.
- [31] Von Blumröder D, Schares G, Norton R, Williams DJ, Esteban-Redondo I, Wright S, et al. Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Vet Parasitol* 2004;120(1-2):11-22.
- [32] Williams DJ, Davison HC, Helmick B, McGarry J, Guy F, Otter A, et al. Evaluation of a commercial ELISA for detecting serum antibody to *Neospora caninum* in cattle. *Vet Rec* 1999;145(20):571-5.
- [33] Ybañez RH, Terkawi MA, Kameyama K, Xuan X, Nishikawa Y. Identification of a highly antigenic region of subtilisin-like serine protease 1 for serodiagnosis of *Neospora caninum* infection. *Clin Vaccine Immunol* 2013;20(10):1617-22.
- [34] Ghalmi F, China B, Kaidi R, Losson B. Evaluation of a SRS2 sandwich commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in bovine and canine sera. *J Vet Diagn Invest* 2009;21(1):108-11.
- [35] Baszler TV, Adams S, Vander-Schalie J, Mathison BA, Kostovic M. Validation of a commercially available monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *J Clin Microbiol* 2001;39(11):3851-7.
- [36] Ghalmi F, China B, Jenkins M, Azzag N, Losson B. Comparison of different serological methods to detect antibodies specific to *Neospora caninum* in bovine and canine sera. *J Vet Diagn Invest* 2014;26(1):136-40.
- [37] Moraveji M, Hosseini A, Moghaddar N, Namavari MM, Eskandari MH. Development of latex agglutination test with recombinant NcSAG1 for the rapid detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Vet Parasitol* 2012;189(2-4):211-7.
- [38] Hu J, Ferroglio E, Trisciuglio A. Immunoblot diagnosis of infection with *Neospora caninum* in cattle based on recombinant NcSAG4 antigen. *Parasitol Res* 2011;108(4):1055-8.
- [39] Rosypal AC, Lindsay DS. The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? *Trends Parasitol* 2005;21(10):439-40.
- [40] Nam HW, Kang SW, Choi WY. Antibody reaction of human anti-*Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. *Korean J Parasitol* 1998;36(4):269-75.
- [41] Petersen E, Lebech M, Jensen L, Lind P, Rask M, Bagger P, et al. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. *Emerg Infect Dis* 1999;5(2):278-80.
- [42] Lobato J, Silva DA, Mineo TW, Amaral JD, Segundo GR, Costa-Cruz JM, et al. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13(1):84-9.
- [43] Marsh AE, Barr BC, Marsh AE, Sverlow K, Ho M, Dubey JP, Conrad PA. Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites. *J Parasitol* 1995;81(4):530-5.
- [44] Stenlund S, Björkman C, Holmdahl OJ, Kindahl H, Ugglå A. Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitol Res* 1997;83(3):214-9.
- [45] Lindsay DS, Dubey JP. Evaluation of anti-coccidial drugs' inhibition of *Neospora caninum* development in cell cultures. *J Parasitol* 1989;75(6):990-2.
- [46] Ho MS, Barr BC, Marsh AE, Anderson ML, Rowe JD, Tarantal AF, et al. Identification of bovine *Neospora* parasites by PCR amplification and specific small-subunit rRNA sequence probe hybridization. *J Clin Microbiol* 1996;34(5):1203-8.
- [47] Ellis JT. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 1998;28(7):1053-60.
- [48] Magnino S, Vigo PG, Fabbri M, Colombo M, Bandi C, Genchi C. Isolation of a bovine *Neospora* from a newborn calf in Italy. *Vet Rec* 1999;144(16):456.
- [49] Ellis JT, McMillan D, Ryce C, Payne S, Atkinson R, Harper PA. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. *Int J Parasitol* 1999;29(10):1589-96.
- [50] Gondim LF, Laski P, Gao L, McAllister MM. Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. *J Parasitol* 2004;90(1):119-22.
- [51] Dubey JP, Vianna MC, Kwok OC, Hill DE, Miska KB, Tuo W, et al. Neosporosis in Beagle dogs: clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 2007;149(3-4):158-66.
- [52] Muradain V, Ferreira LR, Lopes EG, De Oliveira Esmerini P, De Jesus Pena HF, Soares RM, et al. A survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection in urban rodents from Brazil. *J Parasitol* 2012;98(1):128-34.
- [53] McInnes LM, Irwin P, Palmer DG, Ryan UM. In vitro isolation and characterisation of the first canine *Neospora caninum* isolate in Australia. *Vet Parasitol* 2006;137(3-4):355-63.
- [54] Siverajah S, Ryce C, Morrison DA, Ellis JT. Characterization of an alpha tubulin gene sequence from *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni*, and their comparison to homologous genes from Apicomplexa. *Parasitology* 2003;126 (Pt 6):561-9.
- [55] Regidor-Cerrillo J, Pedraza-Díaz S, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM. Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. *J Parasitol* 2006;92(3):517-24.
- [56] Basso W, Schares S, Bärwald A, Herrmann DC, Conrath FJ, Pantchev N, et al. Molecular comparison of *Neospora caninum* oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers. *Vet Parasitol* 2009;160(1-2):43-50.
- [57] Regidor-Cerrillo J, Díez-Fuertes F, García-Culebras A, Moore DP, González-Warleta M, Cuevas C, et al. Genetic diversity and geographic population structure of bovine *Neospora caninum* determined by microsatellite genotyping analysis. *PLoS One* 2013;8(8):e72678.
- [58] Adams RI, Brown KM, Hamilton MB. The impact of microsatellite electrophoretic size homoplasy on multilocus population structure estimates in a tropical tree (*Corythophora alta*) and an anadromous fish (*Morone saxatilis*). *Mol Ecol* 2004;13(9):2579-88.
- [59] Hu Z, Weng X, Xu C, Lin Y, Cheng C, Wei H, et al. Metagenomic next-generation sequencing as a diagnostic tool for toxoplasmic encephalitis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2018;17(1):45.
- [60] DeBarry JD, Kissinger JC. Jumbled genomes: missing Apicomplexan synteny. *Mol Biol Evol* 2011;28(10):2855-71.
- [61] Reid AJ, Vermont SJ, Cotton JA, Harris D, Hill-Cawthorne GA, Könen-Waisman S, et al. Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. *PLoS Pathog* 2012;8(3):e1002567.
- [62] Lorenzi H, Khan A, Behnke MS, Namasyayam S, Swapna LS, Hadjithomas M, et al. Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nat Commun* 2016;7(1):10147.
- [63] Ricklefs RE, Outlaw DC. A molecular clock for malaria parasites. *Science* 2010;329(5988):226-9.
- [64] Ramaprasad A, Mourier T, Naeem R, Malas TB, Moussa E, Panigrahi A, et al. Comprehensive evaluation of *Toxoplasma gondii* VEG and *Neospora caninum* LIV genomes with tachyzoite stage transcriptome and proteome defines novel transcript features. *PLoS One* 2015;10(4):e0124473.
- [65] Howe DK, Sibley LD. Development of molecular genetics for *Neospora caninum*: a complementary system to *Toxoplasma gondii*. *Methods* 1997;13(2):123-33.
- [66] Howe DK, Mercier C, Messina M, Sibley LD. Expression of *Toxoplasma gondii* genes in the closely-related apicomplexan parasite *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol* 1997;86(1):29-36.
- [67] Beckers CJ, Wakefield T, Joiner KA. The expression of *Toxoplasma* proteins in *Neospora caninum* and the identification of a gene encoding a novel rhoptry protein. *Mol Biochem Parasitol* 1997;89(2):209-23.
- [68] Zhang G, Huang X, Boldbaatar D, Battur B, Battsetseg B, Zhang H, et al. Construction of *Neospora caninum* stably expressing TgSAG1 and evaluation of its protective effects against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Vaccine* 2010;28(45):7243-7.
- [69] Pereira LM, Baroni L, Yatsuda AP. A transgenic *Neospora caninum* strain based on mutations of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Exp Parasitol* 2014;138:40-7.
- [70] Pereira LM, Yatsuda AP. The chloramphenicol acetyltransferase vector as a tool for stable tagging of *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol* 2014;196(2):75-81.
- [71] Arranz-Solis D, Regidor-Cerrillo J, Lourido S, Ortega-Mora LM, Saeij JPJ. *Toxoplasma* CRISPR/Cas9 constructs are functional for gene disruption in *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 2018;48(8):597-600.
- [72] Romero JJ, Pérez E, Frankena K. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. *Vet Parasitol* 2004;123(3-4):149-59.
- [73] Naguleswaran A, Cannas A, Keller N, Vonlaufen N, Björkman C, Hemphill A. 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.
- [74] Vonlaufen N, Guetg N, Naguleswaran A, Müller N, Björkman C, Schares G, 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.
- [75] English ED, Adomako-Ankomah Y, Boyle JP. Secreted effectors in *Toxoplasma gondii* and related species: determinants of host range and pathogenesis? *Parasite Immunol* 2015;37(3):127-40.
- [76] Hemphill A, Gajendran N, Sonda S, Fuchs N, Gottstein B, Hentrich B, et al. Identification and characterisation of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol* 1998;28(3):429-38.
- [77] Hemphill A, Vonlaufen N, Naguleswaran A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. *Parasitology* 2006;133(Pt 03):261-78.
- [78] Naguleswaran A, Müller 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.
- [79] Louie K, Nordhausen R, Robinson TW, Barr BC, Conrad PA. Characterization of *Neospora caninum* protease, NcSUB1 (NC-P65), with rabbit anti-N54. *J Parasitol* 2002;88(6):1113-9.

- [80] Taylor S, Barragan A, Su C, Fux B, Fentress SJ, Tang K, et al. A secreted serine/threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* 2006;314(5806):1776–80.
- [81] Saeij JPJ, Boyle JP, Collier S, Taylor S, Sibley LD, Brooke-Powell ET, et al. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* 2006;314(5806):1780–3.
- [82] Fentress SJ, Behnke MS, Dunay IR, Mashayekhi M, Rommereim LM, Fox BA, et al. Phosphorylation of immunity-related GTPases by a parasite secretory kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell Host Microbe* 2010;8(6):484–95.
- [83] Fentress SJ, Sibley LD. The secreted kinase ROP18 defends *Toxoplasma*'s border. *BioEssays* 2011;33(9):693–700.
- [84] Behnke MS, Khan A, Wootton JC, Dubey JP, Tang K, Sibley LD. Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(23):9631–6.
- [85] Behnke MS, Khan A, Lauron EJ, Jimah JR, Wang Q, Tolia NH, et al. Rhopty proteins ROP5 and ROP18 are major murine virulence factors in genetically divergent South American strains of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Genet* 2015;11(8):e1005434.
- [86] Reese ML, Boothroyd JC. A conserved non-canonical motif in the pseudoactive site of the ROP5 pseudokinase domain mediates its effect on *Toxoplasma* virulence. *J Biol Chem* 2011;286(33):29366–75.
- [87] Reese ML, Zeiner GM, Saeij JP, Boothroyd JC, Boyle JP. Polymorphic family of injected pseudokinases is paramount in *Toxoplasma* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(23):9625–30.
- [88] Etheridge RD, Alagunan A, Tang K, Lou HJ, Turk BE, Sibley LD. The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. *Cell Host Microbe* 2014;15(5):537–50.
- [89] Khan A, Taylor S, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. Selection at a single locus leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulent in mice. *PLoS Genet* 2009;5(3):e1000404.
- [90] Lei T, Wang H, Liu J, Nan H, Liu Q. ROP18 is a key factor responsible for virulence difference between *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *PLoS One* 2014;9(6):e99744.
- [91] Baszler TV, Long MT, McElwain TF, Mathison BA. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol* 1999;29(10):1635–46.
- [92] Nishikawa Y, Tragoolpua K, Inoue N, Makala L, Nagasawa H, Otsuka H, et al. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8(4):811–6.
- [93] Spekter K, Leineweber M, Degrandi D, Ince V, Brunder S, Schmidt SK, et al. Antimicrobial effects of murine mesenchymal stromal cells directed against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: role of immunity-related GTPases (IRGs) and guanylate-binding proteins (GBPs). *Med Microbiol Immunol* 2013;202(3):197–206.
- [94] Beiting DP, Peixoto L, Akopyants NS, Beverley SM, Wherry EJ, Christian DA, et al. Differential induction of TLR3-dependent innate immune signaling by closely related parasite species. *PLoS One* 2014;9(2):e88398.
- [95] Saeij JPJ, Collier S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, Boothroyd JC. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 2007;445(7125):324–7.
- [96] Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol* 2012;10(11):766–78.
- [97] Ma L, Liu G, Liu J, Li M, Zhang H, Tang D, et al. *Neospora caninum* ROP16 play an important role in the pathogenicity by phosphorylating host cell STAT3. *Vet Parasitol* 2017;243:135–47.
- [98] Mercier C, Cesbron-Delauw MF. *Toxoplasma* secretory granules: one population or more? *Trends Parasitol* 2015;31(2):60–71.
- [99] Rosowski EE, Lu D, Julien L, Rodda L, Gaiser RA, Jensen KD, et al. Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *J Exp Med* 2011;208(1):195–212.
- [100] Bougdour A, Durandau E, Brenier-Pinchart MP, Ortet P, Barakat M, Kieffer S, et al. Host cell subversion by *Toxoplasma* GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. *Cell Host Microbe* 2013;13(4):489–500.
- [101] Braun L, Brenier-Pinchart MP, Yogavel M, Curt-Varesano A, Curt-Bertini RL, Hussain T, et al. A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation. *J Exp Med* 2013;210(10):2071–86.
- [102] Lally N, Jenkins M, Liddell S, Dubey JP. A dense granule protein (NCDG1) gene from *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol* 1997;87(2):239–43.
- [103] Liddell S, Lally NC, Jenkins MC, Dubey JP. Isolation of the cDNA encoding a dense granule associated antigen (NCDG2) of *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol* 1998;93(1):153–8.
- [104] Pastor-Fernández I, Regidor-Cerrillo J, Álvarez-García G, Marugán-Hernández V, García-Lunar P, Hemphill A, et al. The tandemly repeated NTPase (NTPDase) from *Neospora caninum* is a canonical dense granule protein whose RNA expression, protein secretion and phosphorylation coincides with the tachyzoite egress. *Parasit Vectors* 2016;9(1):352.
- [105] Atkinson R, Harper PA, Ryce C, Morrison DA, Ellis JT. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology* 1999;118(Pt 4):363–70.
- [106] Miller CM, Quinn HE, Windsor PA, Ellis JT. Characterisation of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. *Aust Vet J* 2002;80(10):620–5.
- [107] Lindsay DS, Lenz SD, Cole RA, Dubey JP, Blagburn BL. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *J Parasitol* 1995;81(2):313–5.
- [108] Regidor-Cerrillo J, Álvarez-García G, Pastor-Fernández I, Marugán-Hernández V, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM. Proteome expression changes among virulent and attenuated *Neospora caninum* isolates. *J Proteomics* 2012;75(8):2306–18.
- [109] Regidor-Cerrillo J, García-Lunar P, Pastor-Fernández I, Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Gómez-Bautista M, et al. *Neospora caninum* tachyzoite immunome study reveals differences among three biologically different isolates. *Vet Parasitol* 2015;212(3–4):92–9.
- [110] Reichel MP, Alejandra Ayanegui-Alcérreca M, Gondim LF, Ellis JT. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle the billion dollar question. *Int J Parasitol* 2013;43(2):133–42.
- [111] Weston JF, Heuer C, Williamson NB. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. *Prev Vet Med* 2012;103(2–3):136–44.
- [112] Mansilla FC, Moore DP, Quintana ME, Cardoso N, Hecker YP, Gual I, et al. Safety and immunogenicity of a soluble native *Neospora caninum* tachyzoite-extract vaccine formulated with a soy lecithin/b-glucan adjuvant in pregnant cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2015;165(1–2): 75–80.
- [113] Weber FH, Jackson JA, Sobecki B, Choromanski L, Olsen M, Meinert T, et al. On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *Neospora caninum* for prevention of neospora-associated fetal loss in cattle. *Clin Vaccine Immunol* 2013;20(1):99–105.
- [114] Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, Pérez-Zaballos F, Rodríguez-Marcos S, Blanco-Murcia J, Rodríguez-Bertos A, et al. Effect of vaccination of cattle with the low virulence Nc-Spain 1H isolate of *Neospora caninum* against a heterologous challenge in early and mid-gestation. *Vet Res* 2013;44(1):106.
- [115] Hecker YP, Moore DP, Quattrocchi V, Regidor-Cerrillo J, Verna A, Leunda MR, et al. Immune response and protection provided by live tachyzoites and native antigens from the NC-6 Argentina strain of *Neospora caninum* in pregnant heifers. *Vet Parasitol* 2013;197(3–4):436–46.
- [116] Reichel MP, Moore DP, Hemphill A, Ortega-Mora LM, Dubey JP, Ellis JT. A live vaccine against *Neospora caninum* abortions in cattle. *Vaccine* 2015;33(11):1299–301.
- [117] Nishimura M, Kohara J, Kuroda Y, Hiasa J, Tanaka S, Muroi Y, et al. Oligomannose-coated liposome-entrapped dense granule protein 7 induces protective immune response to *Neospora caninum* in cattle. *Vaccine* 2013;31(35):3528–35.
- [118] Hecker YP, Cóceres V, Wilkowsky SE, Jaramillo Ortiz JM, Morrell EL, Verna AE, et al. A *Neospora caninum* vaccine using recombinant proteins fails to prevent foetal infection in pregnant cattle after experimental intravenous challenge. *Vet Immunol Immunopathol* 2014;162(3–4):142–53.
- [119] Wang JL, Li TT, Elsheikha HM, Chen K, Cong W, Yang WB, et al. Live attenuated Pru: *Dcdpk2* strain of *Toxoplasma gondii* protects against acute, chronic, and congenital toxoplasmosis. *J Infect Dis* 2018;218(5):768–77.