

DOI:10.13350/j.cjpb.220723

· 综述 ·

## 载体介导的艾美耳球虫微线体蛋白疫苗的研制现状\*

李文桂\*\*,陈雅棠

(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所,重庆 400016)

**【摘要】** 艾美耳球虫是鸡球虫病的病原体,疫苗研发是当前的热点领域之一。微线体蛋白免疫原性良好,本研究就卡介苗(rBCG-AMA1/RB)、乳酸乳球菌(rLL-AMA1)、植物乳杆菌(rLp-EtMIC1/EtMIC2/TA4-AMA1)、鼠伤寒沙门氏菌(rSt-5401/EnMIC2/MIC5)、根瘤农杆菌(rAt-MIC2)、酵母(rPP-EtMIC2)和鸡痘病毒(rFPV-RB)等载体介导的艾美耳球虫微线体蛋白疫苗的研究进展进行综述。

**【关键词】** 艾美耳球虫;微线体蛋白;疫苗;综述

**【中图分类号】** S858.33;R382.32

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)07-0848-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jul.;17(7):848-851.]

The status in the research of vector-based vaccine of microneme protein of *Eimeria*

LI Wen-gui, CHEN Ya-tang (Institute of Infectious and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**【Abstract】** *Eimeria* is one type of pathogen agents causing chicken coccidiosis, it recently becomes highlight to control this virus by use of the vaccine. The microneme protein has ideal immunogenicity, it's outlined on the status in the research of vaccine of microneme protein of *Eimeria* mediated by bacteria such as BCG (rBCG-AMA1/RB), *Lactococcus lactis* (rLL-AMA1), *Lactobacillus plantarum* (rLp-EtMIC1/EtMIC2/TA4-AMA1), *Salmonella typhimurium* (rSt-5401/EnMIC2/MIC5), *Agrobacterium tumefaciens* (rAt-MIC2), *Pichia* (rPP-EtMIC2), and virus such as *Fowlpox virus* (rFPV-RB).

**【Key words】** *Eimeria*; microneme protein; vaccine; review

\*\*\*艾美耳球虫(*Eimeria*)引起的鸡球虫病是一种常见的禽类传染病,临床以肠道损伤(尤其是盲肠)、血便或下痢为特点,死亡率达20%~30%。通常艾美耳球虫(*Eimeria*)的种类有7种,其中堆形艾美耳球虫(*E. aceroulina*)、巨型艾美耳球虫(*E. maxima*)和柔嫩艾美耳球虫(*E. tenella*)的致病力较强,和缓艾美耳球虫(*E. mitis*)和早熟艾美耳球虫(*E. praecox*)的致病力弱,布式艾美耳球虫(*E. brunetti*)和毒害艾美耳球虫(*E. necatrix*)在鸡场少见。以前使用抗生素进行化疗导致耐药性和药物残留等问题,现今接种强毒苗或弱毒苗等活疫苗进行防治<sup>[1]</sup>,但强毒苗的免疫剂量不准确,经鸡体传代后卵囊数目不断增加,可引起球虫病的爆发,弱毒苗存在毒力恢复或增强的危险,亟需进一步探索新型疫苗。

艾美耳球虫的微线体主要分泌微线体蛋白(microneme protein, MIC)和顶膜抗原1(Apical membrane antigen 1, AMA1)等蛋白质。MIC蛋白对于球虫运动是必须的,阻断MIC的分泌将阻止寄生虫的体外粘附和体内感染,在免疫逃避中起作用。MIC1蛋白在子孢子和裂殖子阶段表达,与虫体入侵有关;MIC2蛋白是一种酸化蛋白,位于子孢子、第一代裂殖体和第二代裂殖体中,在虫体入侵宿主细胞时大量表达,虫体入侵宿主细胞后迅速消失,可能与免疫逃避有关;Et5401蛋白是MIC4蛋白的C末端序列;MIC5蛋白含有丰富的半胱氨酸基序,形成11个串联的重复区域及Apple结构域。菱形蛋白(rhomboid protein, RP)具有丝氨酸蛋白酶的活性,可水解MIC蛋白,主要参与表皮生长因子及其受体的信号传导,在免疫逃

避中发挥作用。AMA1蛋白是一种高度保守的I型跨膜蛋白,参与虫体顶突的再定位以及虫体棒状体蛋白的分泌,为虫体在细胞内复制提供启动信号。研究显示将这些蛋白的DNA疫苗免疫仔鸡可对抗艾美耳球虫卵囊的攻击感染<sup>[3-8]</sup>,提示它们可作靶抗原进行开发。

细菌和病毒是人类常见的病原体,经过减毒改造后可作为疫苗载体进行使用。这些载体介导的疫苗具有灭活疫苗和活疫苗的优势,能主动感染宿主的细胞,协助外源基因有效进入细胞,产生细胞因子和趋化因子等,从而诱导长期的免疫应答。卡介苗、乳酸乳球菌、植物乳杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、根瘤农杆菌、酵母和鸡痘病毒等载体的减毒株均可以作为疫苗载体。本研究拟概述载体介导的艾美耳球虫微线体蛋白疫苗的研制现状。

## 1 细菌作为表达载体

**1.1 卡介苗** 卡介苗(*Bacille Calmette-Guerin*, BCG)是一种免疫佐剂,可开发为疫苗载体<sup>[9]</sup>。Li等<sup>[10]</sup>以巨型艾美耳球虫子孢子cDNA文库为模板扩增AMA1基因,插入pMV261得pMV261-AMA1,电转BCG,筛选和培养后,免疫印渍显示阳性

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 30801052, 30671835, 30500423, 30200239)。

\*\* **【通讯作者(简介)】** 李文桂(1967-),男,湖北郧县人,博士,研究员,主要从事病原微生物的分子生物学和分子免疫学研究。E-mail: cqliwengui@163.com

血清识别重组菌表达的 46 kDa 蛋白。将  $10^7$  CFU 疫苗口服、滴鼻或皮下注射 1 d 龄的仔鸡,在初次接种后 2 周强化 1 次,在初次接种后 3 周显现血清 IgG 的滴度提升,流式细胞仪(FACS)证实脾  $CD4^+$  和  $CD8^+$  T 细胞的数目增加,脾细胞产生大量 IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-15 和 IL-10 等细胞因子,此时口服  $5 \times 10^4$  堆形艾美耳球虫的卵囊进行攻击,在攻击后 1 周提示免疫组的体重增加,盲肠病变减轻,粪便卵囊的数目减少,以皮下注射免疫组的效果为佳。

Wang 等<sup>[11-12]</sup>以柔嫩艾美耳球虫卵囊的 cDNA 文库为模板扩增 RB 基因,插入 pMD18-T 得 pMD18-RB,与 pMV261 重组得 pMV261-RB,电穿孔转化 BCG,卡那霉素筛选,采取 PCR 技术能扩增出长度 770 bp 的 RB 基因。将  $10^6$  CFU 疫苗滴鼻 1 d 龄的仔鸡,在初次滴鼻后 2 周重复一次,显示血清 IgG 的滴度在初次滴鼻后 2~4 周提升,在初次滴鼻后 4 周提升较高,在初次滴鼻后 4 周经 FACS 证实脾  $CD4^+$  和  $CD8^+$  T 细胞的数目增加,此时口服  $3 \times 10^4$  柔嫩艾美耳球虫的卵囊进行攻击,在攻击后 1 周表明免疫组的体重增加,盲肠病变减轻,减卵囊率为 56.04%。随后他将 RB 基因与 IL-2 基因融合后插入 pMV361 得 pMV361-RB-IL-2,电穿孔转化 BCG,筛选培养,Western blot 证明重组菌表达 40 kDa 的融合蛋白可被阳性血清所识别。将  $10^7$  CFU 疫苗滴鼻或皮下注射 0 d 龄的仔鸡,在初次免疫后 2 周强化 1 次,在初次免疫后 4 周口服  $3 \times 10^4$  柔嫩艾美耳球虫的卵囊进行攻击,在攻击后 1 周提示滴鼻免疫组和皮下注射免疫组的减卵囊率分别为 64.1% 和 56.2%。

**1.2 乳酸乳球菌** 乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, LL)是乳制品工业发酵的重要菌类,是一种有希望的疫苗载体<sup>[43]</sup>。王芬等<sup>[14]</sup>以 pMD18-EtAMA1 为模板扩增 AMA1 基因,插入 pTX8048 得 pTX8048-AMA1,电转 NZ9000 株,Western 杂交表明阳性血清识别重组菌表达 62 kDa 的 EtAMA1-trxA 蛋白,但未进行接种动物的试验。

**1.3 植物乳杆菌** 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)可定植肠道,吸附肠道粘膜,具有抗胆汁酸和免疫佐剂的作用,是一种可口服的疫苗载体<sup>[15]</sup>。金黄葡萄球菌的纤维蛋白 A(Fn-BPA)具有侵袭粘附作用,可增强重组乳酸菌的递送能力。张赞等<sup>[16]</sup>以 pMD18-PgsA-EtMIC1 为模板扩增 PgsA-EtMIC1 基因,插入 pSIP409-FnBPA 得 pSIP409-FnBP-PgsA-EtMIC1,电转 NC8 株,Western blot 提示阳性血清识别重组菌表达的 58 kDa 融合蛋白。将  $10^9$  CFU 疫苗口服 1 d 龄的仔鸡,在初次口服后 2、3、10、11、12 d 重复 5 次,在初次口服后 28 d 显现血清 IgG 的滴度提升,小肠液 sIgA 和血清 IFN- $\gamma$  和 IL-18 升高, FACS 证明外周血单核细胞(PBMC)中  $CD4^+$  和  $CD8^+$  T 细胞的数目增加。Liu 等<sup>[17]</sup>将 EtAMA1/EtMIC2 基因插入 pUC57 得 pUC57-EtAMA1/EtMIC2,与 pLQ9-ES-plm 重组得 pLQ9-EtAMA1/EtMIC2,电转 NC8 株,免疫杂交提示阳性血清可与重组菌表达的 66 kDa 的 EtAMA1 和 56 ku 的 EtMIC2 蛋白起反应。将  $2 \times 10^9$  CFU 疫苗分别在 4、5、6、18、19、20 d 口服 1 d 龄的仔鸡,在初次接种后 30 d 口服  $5 \times 10^4$  柔嫩艾美耳球虫的卵囊进行攻击,在攻击后 1 周显示免疫组的体重增加,盲肠病变显著减轻。

TA4 分子位于孢子的表面,是一个异二聚体糖蛋白,与虫体入侵细胞有关,参与免疫逃避,将其 DNA 疫苗接种仔鸡可

产生交叉保护力<sup>[18]</sup>。枯草芽孢杆菌聚- $\gamma$ -谷氨酸合成酶 A(Pg-SA)是一种表面展示抗原,可以提高重组乳酸菌的表达效率。Liu 等<sup>[19]</sup>以柔嫩艾美耳球虫卵囊的基因组 DNA 为模板扩增 TA4/AMA1 基因,将其融合后插入 pSIP409-PgsA 得 pSIP409-PgsA-TA4-AMA1,电转 NC8 株,Western blot 证明阳性血清结合重组菌表达的 100 kDa 的融合蛋白。将  $10^9$  CFU 疫苗分别在 3、4、5、17、18 和 19 d 口服 0 d 龄的仔鸡,在初次接种后 29 d 显示血清 IgG 和小肠液 sIgA 升高, FACS 证实 PBMC 中  $CD4^+$  和  $CD8^+$  T 细胞的数目增加,在初次接种后 30 d 口服  $5 \times 10^4$  柔嫩艾美耳球虫的卵囊进行攻击,在攻击后 1 周显现免疫组的盲肠病变减轻,粪便的卵囊数目减少。

**1.4 鼠伤寒沙门氏菌** 鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, St)是一种胞内寄生菌,具有粘膜免疫佐剂的作用,可有效表达插入的外源基因<sup>[20]</sup>。Du 等<sup>[21]</sup>以柔嫩艾美耳球虫孢子 cDNA 文库为模板扩增 5401 基因,插入 pGEM-T 得 pGEM-5401,与 pCDNA3-1 重组得 pCD-5401,电转 SL1344 株,筛选培养后,通过 PCR 能扩增出长度 900 bp 的 5401 基因。将  $10^7$ 、 $10^8$  和  $10^9$  CFU 疫苗分别口服 1 d 龄的仔鸡,在初次免疫后 2 周强化 1 次,在初次免疫后 4 周显示血清 IgG 提升,此时口服  $6 \times 10^4$  柔嫩艾美耳球虫的卵囊进行攻击,在攻击后 1 周发现  $10^7$  CFU 免疫组、 $10^8$  CFU 免疫组和  $10^9$  CFU 免疫组的减卵囊率分别为 48.44%、55.0% 和 57.5%;各个免疫组的体重增加,盲肠病变减轻,

谢明权等<sup>[22]</sup>以 pGEM-EnMIC2 为模板扩增 EnMIC2 基因,插入 pYA3342 得 pYA3342-EnMIC2,电转 X4550 株,Western 杂交显示阳性血清结合重组菌表达的 35 kDa 蛋白。将  $10^8$  和  $10^9$  CFU 疫苗分别口服 1 d 龄的仔鸡,在免疫后 3 周显示血清 IgG 和小肠组织 sIgA 的滴度提升,此时口服 500 个毒害艾美耳球虫的卵囊进行攻击,在攻击后 1 周显示  $10^8$  CFU 免疫组和  $10^9$  CFU 免疫组的减卵囊率分别为 26.62% 和 48.92%。孟庆玲等<sup>[23]</sup>将  $10^9$  CFU 的 rSt-MIC5 疫苗口服 1 d 龄的仔鸡,在初次接种后 2 周重复 1 次,在初次接种后 4 周显现血清 IgG 提升, PBMC 增殖,此时口服  $2 \times 10^4$  斯氏艾美耳球虫的卵囊进行攻击,在攻击后 1 周发现免疫组和对照组的存活率分别为 100%(9/9) 和 11.1%(1/9)。

**1.5 根癌农杆菌** 烟草(*Nicotiana tabacum*)是常用的转基因植物反应器<sup>[24]</sup>。Sathish 等<sup>[25]</sup>以柔嫩艾美耳球虫卵囊的总 RNA 为模板扩增 1.2 kb 的 MIC2 基因,插入 pTRA-ERH 得 pTRA-MIC2,转化根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的 LBA4404 株,转染烟草的子叶,培育转基因植株;免疫印渍表明阳性血清识别转基因烟草表达的 55 kDa 的 MIC2 蛋白。将 50  $\mu$ g 重组蛋白加弗氏佐剂肌肉注射 1 d 龄的仔鸡,在初次注射后 7、14 和 21 d 重复 3 次,在初次注射后 28 d 显现血清 IgG 提升, RT-PCR 证实脾组织 IFN- $\gamma$  的转录增加,此时口服  $10^4$  柔嫩艾美耳球虫的卵囊进行攻击,在攻击后 1 周表明免疫组的体重增加,减卵囊率为 65.6%。

**1.6 酵母** 毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的胞壁成分(葡聚糖和甘露寡糖)是一种免疫佐剂,可诱导细胞和体液免疫应答,酵母的真核表达系统可对表达蛋白进行翻译后加工和修饰,同时具有可快速利用的碳

源,操作简单,生长快速和价廉等优点<sup>[26-27]</sup>。Zhang等<sup>[28]</sup>以柔嫩艾美耳球虫卵囊的总RNA为模板扩增EtMIC2基因,插入pTET1.2得pJET-EtMIC2,与pPIC9k重组得pPIC9K-EtMIC2,电转GS115株,Western杂交证实阳性血清结合重组酵母表达的48kDa蛋白。将20μg重组蛋白肌肉注射1d龄的仔鸡,在初次注射后1、2和3周强化3次,在初次注射后4周显现脾细胞分泌高水平IL-17,FACS证实脾CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的数目增加,此时口服6×10<sup>3</sup>巨型艾美耳球虫的卵囊进行攻击,在攻击后1周提示免疫组的减卵囊率为85.01%,抗球虫指数(anti-coccidial index,ACI)为180.46。孙慧等<sup>[29]</sup>将pTET-MIC2与pCTCON2重组得pCTCON2-MIC2,电转酿酒酵母EBY100株,筛选和培养,免疫荧光证实重组酵母能够呈现融合蛋白的分子,但未报道保护力的试验结果。

## 2 鸡痘病毒作为表达载体

鸡痘病毒(*Fowlpox virus*,FPV)的基因组较大,可容纳25kb的外源基因,是一种非复制型的病毒载体,仅在胞浆中复制,是构建多价疫苗的理想载体<sup>[30]</sup>。杨桂连等<sup>[31-33]</sup>以柔嫩艾美耳球虫卵囊的总RNA为模板扩增RB基因,插入pMD18-T得pMD18-RB,与pUTA2重组得pUTA2-RB,加FPV的282E4株转化CEF细胞株,溴脱氧尿苷筛选培养,Western印渍表明阳性血清识别转基因病毒表达的28kDa的RB蛋白。将10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>和10<sup>4</sup>PFU的疫苗皮下注射1d龄的仔鸡,在初次注射后14d重复1次,在初次注射后21d显现血清IgG提升,PBMC增殖,FACS证实PBMC中CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的数目增加,此时口服5×10<sup>4</sup>柔嫩艾美耳球虫的卵囊进行攻击,在攻击后1周提示免疫组的体重增加,盲肠病变减轻;10<sup>2</sup>PFU免疫组、10<sup>3</sup>免疫组和10<sup>4</sup>PFU免疫组的减卵囊率分别为67.5%、71.1%和71.2%,若疫苗仅免疫1次,则各组的保护力分别下降为39.6%、41.1%和41.7%。

## 3 结语

虽然大部分载体介导的艾美耳球虫微线体蛋白疫苗接种禽类后可产生一定的保护力,但它们诱导的保护性免疫应答的水平很低,尚未达到人们的预期水准;人们发现重组BCG疫苗生长缓慢,转化效率低,外源基因的表达需特殊载体等;重组乳酸菌苗长期低剂量口服有可能产生免疫耐受现象;重组沙门氏菌苗的表达产物与天然蛋白存在差异,表达水平较低;转基因植物疫苗很少被公众认可和接受;酵母菌表达的重组蛋白活性较低,不易纯化;病毒载体的自身蛋白及其双链RNA具有免疫佐剂效应,但病毒载体自身具有潜在的致癌和致病性,人群普遍具有抗病毒的抗体,影响其免疫效果。

随着科技的进步,人们将对艾美耳球虫的基因组学、蛋白质组学、代谢组学、转录组学以及表观遗传学等进行深入探索,从而阐明艾美耳球虫微线体蛋白的结构与功能的关系,筛选新的抗原分子,构建多价高效的复合基因疫苗或含有基因佐剂的混合基因疫苗或多表位疫苗;艾美耳球虫的各个阶段和各种虫株都存在特异性抗原,筛选、鉴定和分离保护性强的抗原,将其联合制成多价疫苗;关注艾美耳球虫的虫株变异与宿主遗传的关系;探索基于类转录激活因子效应的核酸酶(TALEN)或基于CRISPR/cas9的基因编辑技术用于疫苗研究;探究这些疫苗的免疫原性、转化效率、MHC限制性以及能否长期在宿主体内表达;研究新型佐剂、疫苗载体和制备融合蛋白,提高疫苗的免

疫原性;在宿主体内准确评估新型疫苗分子的保护性免疫机制;摸索纳米微粒技术引入新型疫苗是否可延长免疫应答的时间,诱导记忆性T细胞的产生;阐明这些问题有助于拓展载体介导的艾美耳球虫微线体蛋白疫苗的开发应用前景。

## 【参考文献】

- [1] Witcombe DM, Smith NC. Strategies for anti-coccidial prophylaxis [J]. *Parasitol*, 2014, 141(11): 1379-1389.
- [2] Pastor-Fernandez I, Kim S, Billington K, et al. Development of cross-protective *Eimeria*-vectored vaccines based on apical membrane antigens [J]. *Int J Parasitol*, 2018, 48(7): 505-518.
- [3] Tomley FM, Bumstead JM, Billington KJ, et al. Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Etmic-2) from the apicomplexan protozoan parasite, *Eimeria tenella* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1996, 79(2): 195-206.
- [4] Urban S, Freeman M. Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain [J]. *Mol Cell*, 2003, 11(6): 1425-1434.
- [5] Wiersma HI, Galuska SE, Tomley FM, et al. A role for coccidian cGMP-dependent protein kinase in motility and invasion [J]. *Int J Parasitol*, 2004, 34(3): 369-380.
- [6] Yan M, Cui XX, Zhao QP, et al. Molecular characterization and protective efficacy of the microneme 2 protein from *Eimeria tenella* [J]. *Parasite*, 2018, 60: 25.
- [7] 王晔, 赵其平, 朱顺海, 等. 柔嫩艾美耳球虫 AMA1 基因 DNA 疫苗的免疫保护效果 [J]. *中国动物传染病学报*, 2019, 27(6): 1-9.
- [8] 刘剑华, 袁橙, 张光际, 等. 鸡柔嫩艾美耳球虫顶膜抗原 1 (AMA1) 的免疫保护效果评估 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020, 23(1): 127-131.
- [9] Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, et al. New use of BCG for recombinant vaccines [J]. *Nature*, 1991, 351(6326): 456-460.
- [10] Li WC, Zhang XK, Du L, et al. *Eimeria maxima*: efficacy of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing apical membrane antigen1 against homologous infection [J]. *Parasitol Res*, 2013, 112(11): 3825-3833.
- [11] Wang QY, Li JH, Zhang XC, et al. Protective immunity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing rhomboid gene against *Eimeria tenella* challenge [J]. *Vet Parasitol*, 2009, 160(3-4): 198-203.
- [12] Wang QY, Li JH, Li J, Zheng J, et al. A novel recombinant BCG vaccine encoding *Eimeria tenella* rhomboid and chicken IL-2 induces protective immunity against coccidiosis [J]. *Korean J Parasitol*, 2014, 52(3): 251-256.
- [13] Wells JM, Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(5): 349-362.
- [14] 王芬, 马春丽, 马德星, 等. 柔嫩艾美耳球虫 AMA1 蛋白多克隆抗体的制备及在乳酸乳球菌中的表达 [J]. *中国兽医科学*, 2015, 45(11): 1130-1135.
- [15] Scheppler L, Vogel M, Zuercher AW, et al. Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccine delivery vehicle [J]. *Vaccine*, 2002, 20(23): 2913-2920.
- [16] 张赞, 刘晶, 高兴, 等. 表面展示柔嫩艾美耳球虫 EtMIC2 蛋白的侵入型乳酸菌的免疫特性研究 [J]. *中国兽医科学*, 2019, 49(5): 619-624.

- [17] Liu Q, Jiang YL, Yang WT, et al. Protective effects of a food-grade recombinant *Lactobacillus plantarum* with surface displayed AMA1 and EtMIC2 proteins of *Eimeria tenella* in broiler chickens[J]. Microbial Cell Fact, 2020, 19:28.
- [18] Song XK, Xu LK, Yan RF, et al. The optimal immunization procedure of DNA vaccine pcDNA-TA4-IL-2 of *Eimeria tenella* and its cross-immunity to *Eimeria necatrix* and *Eimeria aceroulina* [J]. Vet Parasitol, 2009, 159(1):30-36.
- [19] Liu Y, Jiang YL, Liu J, et al. Recombinant invasive *Lactobacillus plantarum* expressing the *Eimeria tenella* fusion gene TA4 and AMA1 induces protection against coccidiosis in chickens[J]. Vet Parasitol, 2020, 283:109161.
- [20] Darji A, Zurlage S, Garbe AI, et al. Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2000, 27(4):341-349.
- [21] Du AF, Wang SH. Efficacy of a DNA vaccine delivered in attenuated *Salmonella typhimurium* against *Eimeria tenella* infection in chickens[J]. Int J Parasitol, 2005, 35(7):777-785.
- [22] 谢明权, 覃宗华, 蔡建平, 等. EnMIC2 重组减毒沙门氏菌的构建及免疫保护效果研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(7):705-710.
- [23] 孟庆玲, 乔军, 才学鹏, 等. 携带兔斯氏艾美耳球虫 MIC-5 基因减毒鼠伤寒沙门菌活疫苗的安全性、稳定性与免疫原性[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(5):659-662.
- [24] Donson J, Kearney CM, Hilf ME, Dawson WO. Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector [J]. PNAS, 1991, 88(16):7204-7208.
- [25] Sathish K, Sriraman R, Subramanian BM, et al. Plant expressed EtMIC2 is an effective immunogen in conferring protection against chicken coccidiosis[J]. Vaccine, 2011, 29(49):9201-9208.
- [26] Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* [J]. Mol Biotechnol, 2000, 16(1):23-52.
- [27] Stubbs AC, Martin KS, Coeshott C, et al. Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity[J]. Nat Med, 2001, 7(5):625-629.
- [28] Zhang J, Chen PP, Sun H, et al. *Pichia pastoris* expressed Et-Mic2 protein as a potential vaccine against chicken coccidiosis [J]. Vet Parasitol, 2014, 205(1-2):62-69.
- [29] 孙慧, 刘卿, 张杰, 等. 柔嫩艾美耳球虫 EtMIC2 的酵母表面展示 [J]. 中国兽医学报, 2014, 34(2):231-235.
- [30] Pastoret PP, Vanderplasschen A. *Poxviruses* as vaccine vectors [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2003, 26(5):343-355.
- [31] 杨桂连, 李建华, 张西臣, 等. 柔嫩艾美耳球虫重组鸡痘病毒的构建与免疫保护研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(1):1099-1105.
- [32] 肇英池, 王晓岑, 张楠, 等. 活性云母组合物液抗鸡柔嫩艾美耳球虫感染的效果[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(4):438-441.
- [33] Yang GL, Li JH, Zhang XC, et al. *Eimeria tenella*: construction of a recombinant *Fowlpox virus* expressing rhomboid gene and its protective efficacy against homologous infection[J]. Exp Parasitol, 2008, 119(1):30-36.

【收稿日期】 2022-03-12 【修回日期】 2022-06-02

(上接 847 页)

- [39] Arturo Carpio, Alfredo Campoverde, Matthew L, et al. Validity of a PCR assay in CSF for the diagnosis of neurocysticercosis[J]. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2017, 4(2):e324.
- [40] Li T, Ito A, Chen X, et al. Usefulness of pumpkin seeds combined with areca nut extract in community based treatment of human taeniasis in northwest Sichuan Province, China [J] Acta Trop, 2012, 124(2):152-157.
- [41] Sotelo J, del Brutto OH, Penagos P, et al. Comparison of therapeutic regimen of anticysticercal drugs for parenchymal brain cysticercosis[J]. J Neurol, 1990(237):69-72.
- [42] Garcia HH, Lescano AG, Gonzales I, et al. Cysticidal efficacy of combined treatment with praziquantel and albendazole for parenchymal brain cysticercosis[J]. Clin Infect Dis, 2016 (62):1375-1379.
- [43] Ahmad R, Khan T, Ahmad B, et al. Neurocysticercosis: a review on status in India, management and current therapeutic interventions[J]. Parasitol Res, 2017, 116(1):21-33.
- [44] Rossignol JF. Nitazoxanide: a first-in-class broad-spectrum antiviral agent[J]. Antiviral Res, 2014, 2(110):94-103.
- [45] White AC, Coyle CM, Rajshekhar V, et al. Diagnosis and treatment of neurocysticercosis: 2017 clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america (IDSA) and the american society of tropical medicine and hygiene (ASTMH) [J]. Am J Trop Med Hyg, 2018(98):945-966.
- [46] Kaif M, Husain M, Ojha BK. Endoscopic management of intraventricular neurocysticercosis[J]. Turk Neurosurg, 2018; 29(1):59-65
- [47] Tan, YT, Zhang SJ, Shu K, et al. Microsurgical treatment of epilepsy with parenchymal neurocysticercosis [J]. Curr Med SCI, 2019(39):984-989.
- [48] Flisser A, Gauci CG, Zoli A, et al. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens[J]. Infect Immun, 2005(7):5292-5297.
- [49] Handali S, Klarman M, Gaspard AN, et al. Multiantigen print immunoassay for comparison of diagnostic antigens for *Taeniasolium* cysticercosis and taeniasis[J]. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(1):68-72.
- [50] 廖德君, 莫兴泽. 中药治疗脑囊尾蚴病的研究进展[J]. 黔南民族医学报, 2017, 30(4):254-256, 259.

【收稿日期】 2022-03-19 【修回日期】 2022-06-09