

弓形虫分子免疫学研究进展

王承民, 何宏轩*, 秦建华, 郭其祯, 陈桂香, 刘俊伟, 王永强, 李培夫, 王丽荣, 刘丽艳

(1. 河南科技学院动物科学学院, 河南新乡 453003; 2. 河北农业大学动物科技学院, 河北保定 071001; 3. 河南省新乡市畜牧局, 河南新乡 453003)

摘要 弓形虫病是由刚第弓形虫引起的一种危害严重的全球性人兽共患寄生虫病, 全世界各国学者对此原虫的研究十分重视, 尤其是近年来对其免疫学的研究成果对深入了解该原虫的致病机理和进行有效的免疫预防非常重要。从宿主感染弓形虫后的免疫效应、免疫诊断及其疫苗等方面阐述了弓形虫分子免疫学研究进展。

关键词 刚第弓形虫; 细胞免疫; 体液免疫; 免疫检测; 疫苗

中图分类号 Q342+.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)15-3698-04

Research Progress in the Molecular Immunology of *Toxoplasma gondii*

WANG Chengmin et al. (Animal Science College, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract *Toxoplasma gondii* is an intestinal coccidium that parasitizes members of the cat family as definitive hosts and has a wide range of intermediate hosts. Infection is common in many warm-blooded animals, including humans. In most cases infection is asymptomatic, but devastating disease can occur. The researchers all over the world have been focusing on studying this parasite. Especially in recent years lots of immunological research results in pathogenesis of *Toxoplasma gondii* are very important for us to make effective immunological prevention. At present, molecular immunology of *Toxoplasma gondii* is an important subject, which has been studied in order to more effectively control it. The research advance in molecular immunology of cell-mediated immunity (CM), humoral immunity, immunodetection, vaccines and diagnose technology of *Toxoplasma gondii* was reviewed.

Key words *Toxoplasma gondii*; CM; Humoral immunity; Immunodetection; Vaccine

弓形虫病(*Toxoplasmosis*)是一种全球性分布的人兽共患寄生虫病,其病原体是一种重要的机会致病原虫——刚第弓形虫(*Toxoplasma gondii*)。近年来随着医源性免疫抑制、器官移植以及艾滋病患者的增多,弓形虫病发病数与日俱增,并常常造成致死性损害。弓形虫通过母婴垂直传播可造成先天性感染,引起胎儿畸形、流产或死亡。许多学者对弓形虫进行了大量实验性研究,笔者就近年来弓形虫分子免疫学方面的研究结果进行了阐述。

1 宿主感染后的免疫效应

1.1 细胞和细胞因子介导的免疫 实验证明细胞免疫在感染弓形虫小鼠的恢复期起着重要作用。SuGuki 等用过继转移免疫实验证明该论点,他们用弓形虫的温度突变株中的 ts-4 株感染 BALB/c 小鼠,该株特点是具感染性,不成囊,感染后 2 个月可从组织中消失,但能引起保护性免疫。当以这种感染小鼠的免疫脾细胞过继转移给正常小鼠,会对致死性感染有抵抗作用,小鼠能够幸存,如果用抗小鼠 T 淋巴细胞的 mAb 加补体处理上述脾细胞再过继转移给小鼠,便失去了保护作用,与对照小鼠一样感染弓形虫后死亡。Robben 等^[1]认为,鼠科动物的循环单核细胞包括分布于正常组织的 G-1(-)/CCR2(-)/CX(3)CR1 细胞和分布在炎症部位的 G-1(+)/CCR2(+)/CX(3)CR1 细胞两大亚群,前者数量多,后者数量少,后者在细胞内弓形虫感染早期阶段迁移到炎症部位。G-1(+)单核细胞与抑制早期虫体的增殖能力有密切关系,如果 G-1(+)单核细胞迁移失败的话,尽管正常的 Th1 细胞会由于虫体的刺激产生高水平的 IL-12、TNF- α 和 γ -IFN,但仍会引起小鼠很高的死亡率。因此认为,CCR2(-/-)小鼠把 G-1(+)单核细胞作为急性弓形虫病抗感染的必要的受体细胞,表明 CCR2- 依赖的 G-1(+)单核细胞的迁移也许是抗细胞内弓形虫感染的重要机制。Villaino 等^[2]研究表

明,IL-27R 的特异性配体的成分 WSX-1 在原始 T 细胞表面表达量很低,而在 CD4(+) 和 CD8(+) T 细胞的表面有高水平的表达。因此,在弓形虫感染期间体内 T 细胞的活化与 WSX-1 的高效表达相关,而在体外 TCR 配体能诱导 WSX-1 的表达。这些研究显示了 IL-27R 在细胞表面的表达水平高低受淋巴细胞活化相关的阳性和阴性信号的调节。此外,WSX-1 在静止的 NK 细胞、静止的 NKT 细胞、效应 T 细胞、调节 T 细胞和记忆 T 细胞表面有高水平的表达,故认为 IL-27 能影响固有免疫和适应性免疫中效应细胞的数量。

1.1.1 干扰素 γ -IFN 的作用。它是 T 淋巴细胞分泌的一种重要淋巴因子。它可提高抗体的合成和致死感染的存活率。Khan 等(1988)在体内、外实验证明, γ -IFN 能激活巨噬细胞杀伤弓形虫,并能抑制培养的成纤维细胞中弓形虫的生长,其作用是由吲哚 2,3-双氧酶,一种色氨酸降解酶的诱发所介导。Mellars 等联系脂质体重组 γ -IFN 能增强腹腔巨噬细胞 H2O2 的释放能力和抗弓形虫的活力,进一步确证抗弓形虫的淋巴介质确是 γ -IFN。在慢性感染弓形虫的小鼠实验中,也表明 γ -IFN 能阻止弓形虫包囊破裂和弓形虫脑炎的发生,如用抗 γ -IFN 的 mAb 处理小鼠,发现小鼠脑中的包囊至少要比正常的多 5 倍,而且可能发展为严重的脑炎,也可出现急性病灶区和大量炎症细胞浸润,因此 Suzuki 等认为,内源性 γ -IFN 在防止小鼠弓形虫慢性感染所致脑炎中起重要作用。

1.1.2 白细胞介素 2(IL-2) 作用。白细胞介素 1(IL-1) 和白细胞介素 2(IL-2) 分别是由巨噬细胞和 T_H 淋巴细胞产生的淋巴因子。Sharma 等(1985)认为,IL-2 对细胞内寄生虫包括弓形虫具有明显的保护效应。作为对照组的生理盐水注射的感染小鼠,至 20 d 全部死亡,而用总量为 300 和 500 U 2 种剂量重组 IL-2 注射的感染鼠,至 31 d 死亡率分别为 40% 和 30%,并且小鼠脑内包囊数量也明显低于对照鼠。免疫机理的研究表明,IL-2 主要增强天然杀伤性细胞的活性,与宿主的抗体合成和巨噬细胞杀伤作用无明显关系,因为在抗体水

基金项目 河南科技学院重点资助项目(0313)。

作者简介 王承民(1978-),男,河北承德人,硕士,讲师,从事人兽共患寄生虫病和分子生物学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2005-10-06

平和虫数上无明显差别。

1.1.3 细胞介导的细胞毒作用(CMC)。Yam 等(1989)报道,从急性弓形虫病患者的周围白细胞中检测到对弓形虫感染的细胞毒细胞,其细胞毒性是由 $CD5^+ CD4^- CD8^+$ 细胞所介导,这些细胞毒细胞可溶解感染弓形虫的HLA-I靶细胞;慢性弓形虫病患者的周围细胞中确有2型T细胞克隆:一型是 $CD5^+ CD4^- CD8^+$ 对感染弓形虫细胞毒细胞;另一型是 $CD5^+ CD4^- CD8^+$ 对弓形虫抗原反应的增殖细胞。证明感染弓形虫细胞,如巨噬细胞和B淋巴细胞具有将抗原提呈给Th($CD4^+$)和Tc($CD8^+$)的活性,引起这2种细胞增殖,并使 $CD8^+$ 细胞分化为效应细胞,从而识别靶细胞抗原和靶细胞上的HLA-I抗原,使靶细胞溶解。

1.1.4 巨噬细胞和天然杀伤性细胞的作用。正常单核巨噬细胞虽能吞噬弓形虫,但不能杀灭它,相反还容其在细胞内继续增殖,而激活后的巨噬细胞能有效地杀伤弓形虫速殖子,在抗弓形虫感染的细胞免疫中起重要作用,-IFN就是通过激活的巨噬细胞起杀灭弓形虫作用的。但Shley等(1986)却报道了弓形虫具有抵抗作用,他们观察到弓形虫能够分泌一种膜质泡,是一种富含表面蛋白质的网状结构,可抑制巨噬细胞的吞噬和消化作用。Hauser等(1982)发现用5000个毒株弓形虫腹腔、静脉或皮下感染BA/B/c小鼠,能增强腹腔渗出细胞与脾细胞的天然杀伤性细胞活性,感染后3d达高峰,若小鼠用硅处理,能去除天然杀伤性细胞毒性;另在慢性弓形虫感染小鼠,也具有内源性腹腔渗出细胞的天然杀伤活性,但脾细胞的天然杀伤性细胞活性不明显。已知IL-2能提高正常鼠的天然杀伤性细胞活性,说明天然杀伤性细胞对于细胞内寄生虫具有重要的天然杀伤作用。

1.2 体液免疫 弓形虫侵入机体后能引起机体高滴度的抗体反应,然而抗体滴度的高低与机体保护性免疫是否一致,却存在着较大的分歧。张君等^[3]用ESA和TLA免疫山羊,无论ESA或者TLA均可刺激机体产生凝集抗体,虽然TLA组具有高滴度的凝集抗体,但是经攻虫后,体温反应时间最长,而ESA组获得了对接种感染的免疫保护,可见保护性抗体的诱生与抗原有关。高滴度抗体的产生必须有T细胞的辅助,成熟的T细胞接受抗原刺激后,在抗原提呈细胞和Th细胞的辅助下成为活化的B细胞,进而分化为浆细胞,合成和分泌各类免疫球蛋白,同时T细胞产生的细胞因子对Ig类型转化起精细的调节作用,-IFN可降低IgE和IgG1a合成,鼠用-IFN单抗处理后,对弓形虫特异性抗体水平有明显提高。IL-4促进Ig转化IgG1a和IgE,在IL-4靶位缺失鼠的血清中,没有检出对弓形虫特异性IgG1a和IgE,但IL-4靶位缺失鼠比对照鼠有稍高水平其他类型的Ig。

早在1948年Sabin等证实特异性抗体在补体参与下,可迅速杀伤破坏速殖子,从而起到抵抗作用。已知IgE抗感染的机制是肥大细胞介导的型变态反应与IgE依赖的杀虫作用。肥大细胞释放化学趋性物质引起嗜酸性粒细胞的增加,IgE依赖的杀虫作用是IgE结合到弓形虫表面,再由效应细胞释放介质损伤虫体,其效应细胞为嗜酸性粒细胞。弓形虫的自然感染是通过消化道途径,而肠内分泌的大量特异性IgA对弓形虫的杀伤和排除有一定的作用,肠内淋巴细胞参

与了对弓形虫的免疫,而IgA是否介导了ADCC效应目前尚未证实,但弓形虫感染后血清中单体IgA产生有明显增加。用特异性IgG调理弓形虫后,可明显提高单核细胞、嗜中性细胞、嗜酸性细胞、腹腔巨噬细胞对弓形虫的溶解,在抗体依赖下杀伤弓形虫作用中,抗体的一个主要作用是捕获寄生虫,将它们集中于效应细胞表面,而在这个过程中抗体受体FcR起了重要作用。

2 免疫诊断

弓形虫病的实验室诊断方法主要有病原学检查、免疫学检测和分子生物学方法。

2.1 检测抗体的诊断方法

2.1.1 染色试验(DI)。采用活滋养体在有致病因子的参与下与样本特异性抗体作用,使虫体表膜破坏而不为美蓝所染。DI为经典的特异血清学方法。但需活的弓形虫,因筛选辅助因子较困难而使其广泛应用受到一定限制。吕元聪等^[4]以弓形虫玻片为抗原,建立的免疫酶染色试验(IEST)与DI的检测结果在已知和未知血清标本中无显著性差异($P>0.05$)。该法操作简便,不需特殊设备,便于在基层推广应用。

2.1.2 间接荧光抗体试验(IFAT)。以整虫为抗原,采用荧光标记的二抗检测特异性抗体。该法获得结果迅速,敏感性高,重复性强,是目前较常用的一种免疫学诊断方法。在流行病学调查及临床诊断中均有较高的价值。该法可用于测定抗体IgM和IgG,IgM出现较早,病程1周左右可呈阳性。特异性IgM的检出是诊断急性感染的可靠指标之一。孕妇IgM阳性者其胎儿畸形率明显高于IgG阳性者。由于IgM不能通过胎盘传给胎儿,如果婴儿血中IgM阳性则表示婴儿本身已受染。类风湿因子或抗核抗体的存在可引起IgM的假阳性,IgG的竞争可导致IgM假阳性反应。采用抗人 μ 链单克隆抗体及免疫吸附法可使IgM检测获得更高的特异性。

2.1.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)。利用酶催化底物反应的生物放大作用,提高特异性抗原免疫学反应的检测敏感性,可用来定位、定性和定量。近年来在此基础上又衍生出了多种方法,如斑点酶联免疫吸附试验(dot-ELISA)、亲和素生物素系统ELISA(ABC ELISA)、双夹心酶联免疫吸附试验(DS ELISA)等。吕元聪等^[5]用同一批血清对IHA(间接血凝试验)、ELISA和IFAT等3种血清学方法诊断弓形虫病进行了比较研究,结果表明:这3种方法检出的阳性率分别为6.9%、15.4%和8.5%,以ELISA最为敏感,而且具有良好的特异性。

2.2 检测循环抗原(CAg)的诊断方法 CAg是急性感染期弓形虫虫体分泌代谢形成的抗原成分。对流免疫电泳、琼脂双扩散方法、ABC ELISA、单抗或多抗的双夹心ELISA等免疫学方法检测CAg是早期确诊弓形虫感染的可靠方法。马以武等^[6]应用放射对流免疫电泳自显影技术(RCE)检测CAg,阳性率高达100%,被认为是一种特异、敏感、简便、快速的检测方法。

2.3 PCR诊断方法 PCR方法是近年来用于动物和人怀孕期间检测先天性弓形虫病的一种方法,主要是为了防止给胎儿造成不必要的后遗症。据Wengcharoen等^[7]采用嵌

套 PCR 方法从动物羊水中提取的弓形虫速殖子扩增 Bl 基因, 结果表明, 从 41 个阳性样品中检测出 38 个, 对所有阴性样品检测结果全部为阴性, 敏感性达到 73%, 特异性达到 100%, 检测效率达 77.1%。因此嵌套 PCR 方法可以作为检测先天性弓形虫病的一种诊断方法。Chabchard 等^[8]也对 PCR 方法由于检测弓形虫 DNA 的敏感性和特异性进行了实验研究, 他们对 60 份阳性样品和 10 份阴性样品中的不同浓度的速殖子进行检测, 从 0.25 个虫体/10 万个白细胞浓度提取的 DNA 扩增出了特异性基因, 试验结果也证明了其特异性达到 100%。该方法与其他实验室诊断方法相比, 具有高敏感性、高特异性和高阳性检出率等优点。

弓形虫免疫学试验阳性检出率与所采用的检测方法有关, 因此主张同时采用 2 种或 2 种以上的试验方法, 以提高检出率。

3 疫苗

疫苗应用是免疫预防的重要手段, 所以研究弓形虫的长期目标是研究弓形虫疫苗, 对弓形虫急性、慢性感染产生保护性。在人类, 弓形虫疫苗应能对弓形虫的先天性及对免疫抑制者的感染产生有效的保护; 在动物, 弓形虫疫苗应防止因动物感染弓形虫而导致的流产以及减少弓形虫感染人类的传染源。

3.1 减毒活疫苗 ts-4 温度敏感株是弓形虫 RH 株突变体。动物实验表明, 以该突变株作为疫苗接种小鼠, 可使其获得抗致死性弓形虫攻击的保护力^[9]。但此类疫苗经长期传代保种可经突变恢复毒力。近年来, 根据刚第弓形虫既可以诱导产生抗其他病原体和肿瘤的非特异性免疫这一特点, 国外有利用 ts-4 温度敏感株作为载体与其他病原体重组使宿主获得针对该病原体的保护性的报道。Charest 等^[10]将疟原虫 PyCSP 蛋白构建至 ts-4 温度敏感株得到 ts-4 重组体 CSC3, 动物实验表明以重组体 CSC3 作为疫苗诱导抗体应答, 当用 P.y 子孢子攻击可出现非特异性保护力, 如再用 PyCSP 重组病毒加强免疫可产生高水平抗疟原虫的特异性免疫反应。

3.2 亚单位疫苗 用病原微生物有效抗原成分制成的疫苗称为亚单位疫苗。Khan 等^[11]报道, 亲和纯化的 p30 蛋白能刺激弓形虫血清阳性病人外周单核细胞产生 γ -干扰素, 诱导细胞毒性 T 细胞产生抗弓形虫作用。但动物试验表明单价亚单位疫苗效果不理想, 与细胞因子或其他抗原联合发展复合多价疫苗成为弓形虫疫苗新的研制方向。Lunden 等^[12]把 P30、P22 以及另一分子量约为 6 000 的抗原混合成免疫刺激复合体(isocons) 免疫小鼠产生了高滴度抗体。Mshina 等^[13]以弓形虫 SAG2 和 SRS1 联合免疫小鼠, 可诱导产生抵抗弓形虫致死性感染的保护力, 并阻止脑内包囊的形成。为了增强疫苗的免疫效果, 使用佐剂也是疫苗发展的一种有效途径。Velge-Roussel 等^[14]以 P30 为抗原、霍乱毒素(CI) 为佐剂, 经鼻内免疫 CBA/J 小鼠, 结果产生了高水平的 IgG 及特异性的细胞免疫反应。Bonenfant 等^[15]将 2 株无毒力的热敏感肠毒素株 LTR72 和 LTK63 作为佐剂, 分别联合弓形虫 SAG1 蛋白经黏膜途径免疫 CBA/J 鼠, 产生了高水平 IgA 和 IgG 抗体, 并且可使脑内包囊数量减少。

3.3 核酸疫苗 核酸疫苗又称为基因疫苗或通称为 DNA 疫苗, 是于 20 世纪 90 年代初发展起来的一项新兴技术, 它是继病原体疫苗、亚单位疫苗之后的第 3 代疫苗。其基本思想是将编码位于真核表达调控元件下的抗原基因的质粒 DNA(或 RNA) 直接注射至机体局部组织(如肌肉、脾脏、黏膜等), 质粒 DNA 在机体局部表达相应抗原蛋白, 并以类似自然感染的方式提呈抗原, 从而全面地诱导特异性体液和细胞免疫应答^[16]。与传统疫苗相比, 核酸疫苗具有独特的优势和潜能: 能够激发机体全面的免疫应答, 其保守抗原的保护性免疫应答对不同亚型的病原体具有交叉抵抗作用; 能联合免疫, 即可将编码不同抗原的基因构建在同一质粒中, 或将不同抗原基因的多种重组质粒联合应用, 制备多价核酸疫苗; 核酸疫苗表达的抗原接近天然构象, 抗原性强, 因此免疫效果好, 免疫应答持久; 不存在减毒活疫苗毒力回升的危险, 且能引起 CTL 应答; 核酸疫苗既有预防作用, 也有治疗作用; 制备方便, 成本低廉, 便于贮藏和运输。目前, 核酸疫苗已在疟疾^[17]、利什曼病^[18]等寄生虫病的防治中得到试验和应用。在弓形虫核酸疫苗研究方面, 以 SAG1 基因为基础构建的 DNA 疫苗已在小鼠等动物体内进行了研究。Angus 等^[19]构建了 PCMVTOXO 重组质粒对小鼠进行了免疫, 获得一定的免疫力和保护力; Nelsen 等^[20]构建了 pLTPASAGA 质粒, 可使 80%~100% 的免疫小鼠获得抵抗弓形虫 RH 株致死性攻击的保护力。以致密颗粒抗原基因 GRA1^[21]、GRA4^[22] 构建的 DNA 疫苗在小鼠体内的研究中亦获得了抗弓形虫感染的保护性。此后, 人们又以多价核酸疫苗作为研究重点, Vercammen 等^[23]将编码 GRA1、GRA2 以及 ROP2 基因的质粒免疫小鼠, 结果产生了部分免疫保护性; Fachado 等^[24]将编码 P30 ROP2 基因的 pcDNA3 质粒免疫小鼠, 获得了持久的抗弓形虫感染的保护力; Mhaned 等^[25]将编码弓形虫热激蛋白(HSP70) 基因的质粒 pME18100 免疫小鼠, 结果显示其能明显降低体内感染弓形虫的数量, 且此疫苗的疗效能维持 3 个多月, 同编码弓形虫 SAG1 基因的质粒免疫小鼠相比较, 其保护性效果更加显著。陈海峰等^[26]将 p30-ROP1 复合基因在体外连接后, 制备真核表达质粒免疫小鼠, 结果显示: 能够同时激发机体的体液免疫和细胞免疫应答, 有效地拮抗了弓形虫的感染。Saito 等^[27]将编码 SAG1 抗原的质粒使用基因枪对小鼠进行皮内注射, 随后对接种处的皮肤进行同种异体移植, 结果表明: 其能够刺激机体产生治疗性蛋白, 有效地抵抗弓形虫致死性攻击。然而此种基因疫苗有效性的分子基础还不清楚, 有待于进一步深入研究。Mévellec 等^[28]对抗弓形虫病多价疫苗进行了研究, 选择了刚第弓形虫的 2 个抗原 SAG1 和 GRA4, 研究表明: 表达 GRA4(pGRA4) 或 SAG1(pSAG1 mt) 的质粒 DNA 疫苗免疫敏感的 C57BL/6 小鼠, 用口服 76K 型 II 株弓形虫包囊感染, 可明显降低死亡率, 存活率达到 62%; 如用 pGRA4 和 pSAG1 mt 联合免疫, 保护率可提高到 75%; 如果用编码 GM-CSF 的质粒联合免疫, 存活率可达到 87%。给 Swiss OF1 小鼠口服编码 GM-CSF 的质粒疫苗可明显阻碍大脑包囊的形成, 与对照组相比具有明显高的存活率。研究表明: 被保护小鼠明显形成了对先天性弓形虫的 SAG1 和

GRA4 抗原的特异性的体液和细胞 Th1 的反应。因此认为, 用抗原(SAG1 and GRA4) 和细胞因子(GM-CSF) 联合制备的多价疫苗可以提高对弓形虫病的保护。Yang P L 等^[29] 通过 PCR 方法扩增了 MEG 基因, 并克隆到 pET32a 原核表达载体上, 成功地构建了 pET32a-MEG 质粒载体, 转入到 BL21 (DE3) 细菌中进行表达, 用 SDS-PAGE 和 Western blotting 进行鉴定, 结果表明: 该蛋白的分子量是 31 000, 通过用感染 B36 和 RH 弓形虫株的小鼠的抗血清分别进行识别。证明这个重组的多肽抗原具有良好的抗原性, 并在弓形虫病的诊断和疫苗开发方面具有潜在的应用价值。

弓形虫核酸疫苗的研究已取得了比较可喜的成绩, 但是核酸疫苗的应用还存在着不少问题, 主要是其安全性问题限制了在人体上的应用。如质粒 DNA 是否会整合到宿主基因组中, 造成插入突变而导致体内癌基因的活化或抑癌基因的失活; 抗体在机体内的长期表达是否对免疫系统产生影响, 导致宿主的免疫耐受或自身免疫反应; 将质粒 DNA 注入机体后抗原基因的表达调控等, 这些都是核酸疫苗在实际应用中迫切需要解决的问题。

参考文献

- [1] ROBBEN P M, LAREGNA M, KUZIEL W A, et al. Recruitment of G-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis[J]. *J Exp Med*, 2005, 201(11): 1761 - 1769.
- [2] MILARNO A V, LARKIN J R D, SARIS C J, et al. Positive and negative regulation of the IL-27 receptor during lymphoid cell activation[J]. *J Immunol*, 2005, 174(12): 7684 - 7691.
- [3] 张君. 弓形虫 ES 抗原激活免疫细胞的作用[J]. *西北农业学报*, 2001, 10(2): 28 - 31.
- [4] 吕元聪. 免疫酶染色实验诊断弓形虫感染的初步研究[J]. *预防医学情报杂志*, 1994, 10(1): 24 - 25.
- [5] 吕元聪. 不同血清学方法诊断弓形虫病的比较[J]. *广西预防医学*, 1995, 1(5): 278 - 280.
- [6] 马以武. 放射对流免疫电泳自显影法检测弓形虫病抗原的研究 G// 弓形虫病资料汇编: 第3 集. 1993: 40.
- [7] WENGCHAROENJ T, CHABCHALARD R, SUKTHANA Y. PCR technique for detecting *Toxoplasma gondii* in animal amniotic fluid[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2004, 35(4): 792 - 795.
- [8] CHABCHALARD R, WENGCHAROENJ T, SUKTHANA Y. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* DNA added to laboratory samples[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2005, 36(2): 408 - 411.
- [9] GAZZINELLI R T, HAKIM F T, HENY S, et al. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in γ -IFN production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine[J]. *J Immunol*, 1991, 146(1): 286 - 292.
- [10] CHAREST H, SEDEGAH M, YAP G S, et al. Recombinant attenuated *Toxoplasma gondii* expressing the *plasmodyodii* circumsporozoite protein provides highly effective priming for CD8+ T cell-dependent protective immunity against malaria[J]. *J Immunol*, 2000, 165(4): 2084 - 2092.
- [11] KHANI A, ECKEL M E, PFEFFERKORNER E R, et al. Production of interferon by cultured human lymphocytes stimulated with a purified β 0 protein from *Toxoplasma gondii*[J]. *J Infect Dis*, 1988, 157: 979.
- [12] LUNDEN A, LOVGREN K, UGLA A, et al. Immune response and resistance to *Toxoplasma gondii* in mice immunized with antigen of the parasite incorporated into immunostimulating complexes[J]. *Infect Immun*, 1993, 61(6): 2639 - 2643.
- [13] MISHIMA M, XUAN X, SHIODA A, et al. Modified protection against *Toxoplasma gondii* lethal infection by vaccination with SAG2 and SRS1[J]. *Vet Med*, 2001, 63(4): 433 - 438.
- [14] VELGE RORSELE F, MARCELOP, LEPAGE A C, et al. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cells into both NALT and GALT compartments[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(2): 969 - 972.
- [15] BONINFANT C, DINER, POISSONNI, et al. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*[J]. *Infect Immun*, 2001, 69(3): 1605 - 1612.
- [16] 熊思东, 徐薇. DNA 疫苗的研究进展[J]. *中国处方药*, 2003(2): 35 - 37.
- [17] HOFFMANS L, SEDEGAH M, HEDSTROM R C. Protection against malaria by immunization with a *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein nucleic acid vaccine[J]. *Vaccine*, 1994, 12(16): 1529 - 1533.
- [18] XU D, HEWF Y. Genetic vaccination against leishmaniasis[J]. *Vaccine*, 1994, 12: 1534 - 1536.
- [19] AUGUS C W. Nucleic acid vaccination against *Toxoplasma gondii* in mice[J]. *J Eukaryot Microbiol*, 1996, 43(5): 117.
- [20] NELSEN H V, LAUEMLERS L, CHRISTIANSEN L, et al. Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene[J]. *Infect Immun*, 1999, 67: 6358 - 6363.
- [21] BOUT D. Generation of *Toxoplasma gondii* GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan particles: preparation, characterization, and preliminary in vivo studies[J]. *Int J Pharmaceutics*, 2003, 266(1/2): 17 - 27.
- [22] DESOLME B, MARIE NOELLE M, BUZON GAIL D, et al. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene[J]. *Vaccine*, 2000, 18: 2512 - 2521.
- [23] VERCAMMEN M, SCIOZZA T, HUYGEN K, et al. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7 and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice[J]. *Infect Immun*, 2000, 68: 38 - 45.
- [24] FACHADO A, RODRIGUEZ A, ANGEL S O, et al. Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal toxoplasmosis in mice[J]. *Vaccine*, 2003, 21(13-14): 1327 - 1335.
- [25] MOHAMED R M, ACSAI F, CHEN M, et al. Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes[J]. *Vaccine*, 2003, 21(21/22): 2852 - 2861.
- [26] 陈海峰, 郑焕钦, 徐劲, 等. SAG1 和 ROP1 混合基因真核表达质粒接种小鼠诱导产生拮抗致死性弓形虫感染的保护性免疫[J]. *热带医学杂志*, 2003, 3(1): 15 - 18.
- [27] SAITO S, ACSAI F, YANO A, et al. Establishment of gene vaccinated skin grafting against *Toxoplasma gondii* infection in mice[J]. *Vaccine*, 2001, 19(21-72): 2172 - 2180.
- [28] MEVELEC M N, BOUT D, DESOLME B, et al. Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronic and congenital toxoplasmosis in mice[J]. *Vaccine*, 2005, 23(36): 4489 - 4499.
- [29] 杨培梁, 陈晓光, 王元占, 等. 具有免疫反应性的弓形虫多表位抗原在大肠杆菌中的可溶性表达和鉴定[J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25(5): 528 - 530, 544.