

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.08.13

动物弓形虫检测方法研究进展

刘业兵¹, 曹利利², 郭衍冰², 才学鹏^{1*}

(1. 中国兽药药品监察所, 北京 100081; 2. 吉林省畜牧兽医科学研究所, 长春 130062)

[收稿日期] 2018-04-30 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 08-0074-06 [中图分类号] S852.65

[摘要] 弓形虫病(*Toxoplasmosis*)是由弓形虫(*Toxoplasma gondii*)引起的一种人兽共患寄生虫病,危害严重且分布广泛,目前尚未有理想的防治药物。因此,及时准确的检测对于防治弓形虫病尤为重要。就弓形虫的病原学检测、血清学检测及分子生物学检测等方法进行了综述,介绍了动物弓形虫检测中各类方法的研究现状及应用情况,分析了各种技术的优点与局限性,以期对动物弓形虫检测方法的发展和研究提供参考。

[关键词] 动物弓形虫;病原学检测;血清学检测;分子生物学检测

Research Progress of *Toxoplasma gondii* Detection Methods in Animals

LIU Ye-bing¹, CAO Li-li², GUO Yan-bing², CAI Xue-peng^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

2. Jilin Institute of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, Changchun 130062, China)

Corresponding author: CAI Xue-peng, E-mail:caixp@vip.163.com

Abstract: *Toxoplasmosis* is a zoonotic parasitic disease caused by *Toxoplasma gondii*. The harm of disease is severe and widely distributed. At present, there is no ideal medicine for prevention and treatment. Therefore, timely and accurate detection is particularly important for the prevention and treatment of *Toxoplasmosis*. In this paper, the etiological detection, serological detection and molecular biological detection of *Toxoplasma gondii* were reviewed. By summarizing various methods commonly used in animal toxoplasma testing in recent years, the advantages, limitations, or research status of various technologies are briefly summarized and analyzed, in order to provide references for the development and research ideas of the detection techniques of *Toxoplasma gondii* in animals.

Key words: animal toxoplasma; etiological diagnosis; serological diagnosis; molecular biological diagnosis

弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是一种细胞内寄生虫,可感染所有温血动物^[1-2]。感染宿主后随着血液到达全身各个部位,对人及动物造成极大的威胁。人感染率一般为 10%~60%^[3],最高可达 95%^[4],我国人群弓形虫平均感染率约为 10%^[5],

孕妇感染弓形虫后约有 20% 的机率从母体垂直传播给胎儿^[6],引起胎儿先天性感染,造成流产或死胎等。弓形虫感染免疫功能减退或受损的机体可能会造成广泛的病理损害甚至危及生命。

弓形虫可感染猪、牛、羊等家畜,在一些伴侣动

作者简介:刘业兵,博士,研究员,从事动物传染病的检测与疫苗研究。

通讯作者:才学鹏。E-mail:caixp@vip.163.com

物犬、猫、兔等弓形虫感染情况较为普遍,在给畜牧业带来巨大经济损失的同时,也为食品安全与人类健康埋下了重大隐患^[7]。弓形虫感染动物后常表现为非特异的临床症状,无法根据临床症状实现准确诊断。因此,了解动物弓形虫检测技术的发展及应用情况,对切实维护养殖业安全、动物源性食品安全、公共卫生安全至关重要。

1 病原学检测

病原学检查常用的方法包括镜检法和接种法。前者主要是根据样本(肺、肝、淋巴结或体液、脑脊液等)特性,选择涂片、固定或染色等方式通过显微镜观察结果^[8];后者是将样本经处理后通过接种至动物、鸡胚或细胞(如 Hela、Vero)等进行培养,而后检测弓形虫的方法^[9],这两种方法虽然不适合大批量样本的快速检测,但操作较为简单,结果直观可靠,在动物弓形虫的诊断及预防中发挥了重要作用。Khademvatan S 等以显微镜直接涂片检查了伊朗 230 只啮齿动物的弓形虫寄生情况,结果显示有 1 例感染^[10]。Atasever A 等使用血清为弓形虫阳性的鹌鹑组织接种小鼠,并顺利从感染小鼠的腹膜液中分离并鉴定出弓形虫^[11]。在弓形虫病的检测实践过程中,传统病原学检测方法因费时、费力以及检出率低等原因,已无法满足高效、快速检测人和动物弓形虫感染的需求。

2 血清学检测

血清学方法是上个世纪实验室检测弓形虫的首选和最常用的方法。该方法主要使用弓形虫特异性抗原,通过测定宿主感染后体内相应抗体(IgA、IgM、IgG 和 IgE)进行判定。大多数血清学方法使用弓形虫裂解物抗原(TLA)、小鼠或组织培养物中的速殖子抗原作为天然抗原。但是,制备这些抗原所需的实验室条件及技术要求各不相同,且制备费时、成本较高以及存在感染风险等问题不容忽视^[12]。

2.1 萨宾-费尔德曼染色试验(Sabin-Feldman dye test, SFDT) Sabin 和 Fedman 1948 年首次提出 SFDT,利用活的弓形虫滋养体被碱性美蓝染成蓝色的特性,以加入致活剂和免疫血清(抗体)后不着色或着色很淡为判断阳性的依据,可用于早期检测,被认为是弓形虫感染血清学检测的“金标准”,

很多学者运用 SFDT 法对不同动物进行过弓形虫检测。Chadwick EA 等通过该方法检测英国水獭中弓形虫的感染率为 39.5%,表明淡水生态系统因粪便含有卵囊而导致较高的流行率^[13]。Beyhan YE 等以 SFDT 检测发现,弓形虫在研究区域的水牛中相当常见,感染率高达 87.79%^[14]。SFDT 与其他方法相比具有较高的符合率,作为一种最早被使用和公认的敏感度高、特异性强、重复性好的血清免疫学方法,因其需要以活虫为抗原和含有辅助因子的血清作为致活剂,不仅增加了试验的危险性,还加大了检测成本及操作难度,极大限制了该方法的推广应用。

2.2 凝集试验

2.2.1 改良凝集试验(Modified agglutination test, MAT) MAT 是 Dubey 和 Desmonts 于 1987 年在直接凝集试验(Direct haemagglutination test, DAT)基础上建立的一种特异、敏感的弓形虫检测方法。检测前只需制备纯净的弓形虫速殖子,其表面抗原能够与被检血清中弓形虫特异性 IgG 抗体发生交联反应,经染色后可依据反应孔底部的抗原积层进行判断。MAT 的特异性和敏感性与 DAT 相似,有报道称 MAT 在对犬血清检测过程中会出现较高的假阴性^[15],但该方法对其他寄生虫无特异性反应,且操作程序及所需试验工具相对简单,判定标准明确,对于样本的初筛具有重要的意义。Feg V 等以 MAT 法检测散养鸡群弓形虫感染情况,结果显示感染率为 16.6%^[16]。Almería S 等利用 MAT 法调查发现,绵羊的弓形虫感染率为 41.2%,牛为 18.6%,山羊为 5.6%;在野生蹄类动物中,红鹿的弓形虫感染率为 10.5%,黧鹿为 15.6%,摩弗伦羊为 5.6%,西班牙山羊为 5.6%,獐鹿为 13.6%,野猪为 18.6%^[17]。Heddergott M 等用 MAT 在欧洲中部检测浣熊,结果发现约有 37.4%的感染弓形虫^[18]。至今, MAT 方法因其良好的特异性及敏感性一直被各国广泛应用于动物弓形虫的调查或研究工作中。

2.2.2 间接血凝试验(Indirect hemagglutination test, IHA) IHA 是利用弓形虫可溶性抗原致敏于红细胞表面,当与相应抗体相互反应时即可出现肉眼可见的凝集。因 IHA 方法具有操作简便、敏感性高、特异性强等特点,故而适于大规模的流行性调

查。Zhang XX 等对我国北方流浪狗检测发现弓形虫感染率为 14.05%^[19]。Luo H 等对我国江西省动物园及家畜弓形虫感染调查结果显示,长颈鹿感染率为 27%,狼为 20%,河马为 17%,小天鹅为 22%;家畜中山羊感染率为 10%,水牛为 17%,牛为 11%^[20]。同时,对湖北野生动物的调查结果显示,野猪感染率为 7.2%,野兔为 5.1%,野鸡为 12.6%^[21]。Wu F 等利用 IHA 法在屠宰猪中检测弓形虫感染率为 19.9%^[22]。但是,致敏红细胞的不稳定性使该方法易产生非特异性凝集,与其他诊断方法相比重复性较差^[23]。

2.2.3 乳胶凝集试验 (Latex agglutination test, LAT) LAT 是以乳胶颗粒包被弓形虫可溶性抗原,加入待检血清后,通过观察凝集反应进行结果判定,若结果为阳性则需要再以其他血清学方法开展进一步检查。Patel KK 等以市售 LAT 和 ELISA 试剂检测新西兰的养殖红鹿,以此评估两者敏感性和特异性分别为 84.4% 和 91.1%^[24]。Oi M 等利用商品化 LAT 调查了日本东京 1999-2001 年和 2009-2011 年间被收容的猫、狗的弓形虫感染血清阳性率,结果显示十年中感染率几乎无变化(猫由 5.6% 变为 6.7%,狗由 1.8% 变为 1.9%)^[25]。可以说, LAT 具有操作简便、结果易判及特异性良好等特点,能够快速方便的检测到抗弓形虫 IgG 抗体,适合于动物弓形虫的早期感染和抗体检测,常作为现场检测和大范围流行病学筛查的手段。

2.3 间接荧光抗体试验 (Indirect fluorescence antibody test, IFAT) 间接荧光抗体试验以固定的弓形虫速殖子制作抗原片,通过荧光素标记的二抗检测特异性抗体,具有较高的敏感性、特异性和重现性等优点,被广泛应用于动物弓形虫血清 IgG 或 IgM 抗体的检测,是目前检测早期感染较为理想的血清学试验方法之一^[26]。Gos ML 等通过该方法以弓形虫 (RH 株) 和犬新孢子虫 (NC1 株) 速殖子作为抗原,使用兔抗山羊 IgG-FITC 的二抗来检测阿根廷两个省山羊的弓形虫和犬新孢子虫的感染情况,结果显示流行率分别为 40.8% 和 5.5%^[27]。Machacova T 等使用 IFAT 发现意大利北部的兔子弓形虫和犬新孢子虫感染率分别为 14.6% 和

1.2%^[28]。Bártová E 等对尼日利亚三个州的 120 匹马和 24 头驴进行弓形虫和新孢子虫检测发现,马的感染率分别为 24% 和 8%;驴中仅检测到弓形虫,血清阳性率为 17%^[29]。目前,该技术在国内外广泛被应用于流行病学调查,且已有敏感、稳定的市售试剂盒,相比之下,国内关于 IFAT 检测动物感染弓形虫的报道较少,可能因其需要专业荧光显微镜观察而限制了该方法的推广使用。

2.4 免疫层析技术 (Gold immunochromatographic assay, GICA) GICA 主要由标记技术和层析技术组成,利用抗原与抗体反应原理,以胶体金作为示踪标志物,通过固相膜为载体而设计的检测方法。作为一种简单、便捷的血清学检测方法,适于养殖场及野外现场动物弓形虫的检测。王艳等将利用弓形虫重组抗原 SAG1 组装成胶体金免疫层析试纸条筛选犬弓形虫病,与 ELISA 试剂盒进行对比符合率较高^[30]。孙雪霏利用弓形虫重组蛋白 GRA7 制备胶体金试检测纸条,检测 176 份猪血清的结果与 Gold-ELISA 方法比较具有较高的一致性^[31]。目前,免疫层析技术因具有快速、操作简便、结果易判和无需特定仪器等优点,得到了广泛的应用。但是当前市场中试纸条的产品质量良莠不齐,存在特异性不高、假阳/阴性等现象。

2.5 酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) ELISA 方法利用酶的高效催化作用及底物放大反应效果,使检测灵敏度大大提高,提高了特异性抗原和抗体在免疫反应过程中的敏感性,既可用于检测抗原也可以检测抗体。目前,国内外已研制出很多反应灵敏、特异性高、重复性好的动物弓形虫 ELISA 检测试剂盒,主要检测循环抗原 (CAg) 和特异性抗体 (IgM 和 IgG),适于大批量血清样品的检测,是血清学方法中一种方便且安全的方法。常用的包括间接 ELISA、斑点 ELISA (Dot-ELISA)、亲和素-生物素复合 ELISA (ABC-ELISA) 及双抗夹心 ELISA (DS-ELISA) 等。如 Zhuo X 等以弓形虫 rMAG1 为包被抗原建立的间接 ELISA 检测方法,对 93 份狗血清进行检测,结果显示其特异性和敏感性均高于以 TLA 为包被抗原建立的间接 ELISA 方法^[32]。宫枫举等建立了检测

弓形虫循环抗原的夹心 ABC-ELISA 方法,检测 68 份猪临床血样与 Nest-PCR 结果一致,表明该方法特异性强、敏感性高,可用于弓形虫急性感染的早期或活动期的诊断^[33]。寇金华用制备的抗弓形虫重组蛋白 SAG3 单克隆抗体建立猪弓形虫双抗夹心 ELISA 法,并对广东、吉林地区各 94 份猪血清样品进行检测,阳性率分别为 20.2% 和 11.7%,与建立的胶体金试纸条做对比,两者符合率分别为 90.90% 和 89.47%^[34]。ELISA 及其衍生的一系列血清学方法具有可重复、易自动化和标准化等特点,还能用于定性和定量检测,是目前应用最广的动物弓形虫检测方法。

3 分子生物学检测

3.1 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) PCR 技术可在较短时间内扩增弓形虫基因组的特定片段,产生数百万个拷贝的靶 DNA 分子,与其他衍生出的检测方法,如巢氏 PCR、多重 PCR 和 PCR-RFLP 等方法一样,都能通过多次扩增基因片段而提升检测的敏感性和特异性。常用的引物靶基因有 B1 基因、529 bp 重复序列、18S rDNA、核糖体内转录间隔区 (ITS) 和 SAG1 (P30) 基因等,这些基因在所有弓形虫株中均为高度保守。Liu XC 等基于弓形虫 ITS-1 基因构建 PCR 法,对鸡场进行检测,结果显示 2% 的散养鸡场为弓形虫阳性,而规模养殖场未发现弓形虫^[35]。Nabi H 等的研究表明,与显微镜法相比,PCR 是检测猫弓形虫粪便卵囊的更可靠方法^[36]。Cong W 等以半巢式 PCR 检测弓形虫 B1 基因和 PCR-RFLP 方法对我国山东省 618 份驴肌肉样本进行检测,并首次从驴体内分离出弓形虫 ToxoDB#1 基因型^[37]。Lukasova R 等对 2014-2015 年期间来自南非 110 份野生鸟和 15 份家养鸟的脑组织样本进行调查,通过 PCR 方法确定 2.7% 的野生鸟存在弓形虫感染,且采用多重 PCR 对阳性样品进行基因分型分析,结果确定红眼鸽感染的弓形虫为 II 型^[38]。随着技术体系的不断完善和发展,PCR 及相关衍生技术因快速、灵敏、简便和可靠等特点被广泛应用。

3.2 实时定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, qPCR) qPCR 是将探针技术和 PCR 技术相结合,

每个循环中通过探针和嵌合染料检测到扩增产物,利用标准已知浓度进行定量,又称荧光定量 PCR。该方法具有较高的特异性和敏感性,可用于评估动物弓形虫的感染强度及治疗效果。Sroka J 等检测 60 份羊奶样品,阳性率为 65%,而巢式 PCR 仅为 43%^[39]。Camilo LM 等利用 B1 和 REP-529 引物对 807 个巴西患者临床样品进行 RT-PCR 测定,结果显示 REP-529 引物组优于 B1 组^[40]。由于 qPCR 是一个单管封闭系统,相比常规 PCR 和巢式 PCR 等具有灵敏度高和假阳性较少等优势已被广泛应用。

3.3 环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) LAMP 是在 Bst DNA 聚合酶参与下用 4 对引物识别弓形虫靶基因的 6 个区域,在等温条件下使靶基因高效扩增,产物可通过荧光定量、电泳检测,也可通过浊度计或者离心后肉眼观察沉淀的方法。Lass A 等通过 RT-PCR 和靶向 B1 基因的 LAMP 方法分析弓形虫病的起源可能追溯到空气^[41]。Lalle M 等以 529 bp 重复序列为靶向的 LAMP 检测到每 50 g 即食生菜中弓形虫卵囊为 25 个^[42]。由于 LAMP 检测时仅需水浴或普通加热装置,能直接观察到扩增产物,在没有精密仪器条件下是一种快捷、简便、敏感的诊断方法,其灵敏度和扩增效率远高于常规 PCR。

4 问题与展望

弓形虫是一种机会性致病原虫,迄今尚无理想的治疗药物,因而精准的检测对于动物弓形虫的有效防控至关重要。病原学检测方法直观且准确性较高,但大规模检测存在工作量和误差较大,费时费力,无法满足检测需求。灵敏度高、特异性强的分子生物学方法为我们提供了一种较为准确且标准化的检测手段,但检测过程繁琐,需特殊仪器设备及人员素质要求高,大大降低了在基层的推广使用。血清学检测方法尤其是 ELISA 方法是目前临床应用最广泛的检测方法,然而,纵观国内外动物弓形虫血清学检测方法的研究及应用现状,大多数试剂盒都使用 TLA,目的是欲获得较高敏感性和特异性的检测结果,这些方法却存在普遍的局限性,如无法估计弓形虫感染的准确阶段,试验难以进行标准化规范和受其他寄生虫干扰等。因此,动物弓

形虫检测仍存在诸多问题亟待解决。

然而,相较于以往,动物弓形虫的检测技术已有较大进展,国内外弓形虫检测相关产品的研究也越来越多,很多研究成果已经或正在从实验室向临床应用转化。如今,基因工程技术发展日趋成熟,弓形虫抗原相关研究有了很多新进展,随着弓形虫重组抗原、嵌合抗原和多表位肽抗原研究不断深入,人们逐步以重组抗原代替 TLA 进行动物弓形虫的血清学检测,打破传统检测方法的局限性已不再是空谈。相信随着科技的不断进步,动物弓形虫检测方法将会朝着简便、快速、精准、经济以及满足多种检测需求的发展方向继续前行。

参考文献:

- [1] Rostami A, Riahi S M, Fakhri Y, *et al.* The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among wild boars: a systematic review and meta-analysis[J]. *Veterinary Parasitology*, 2017, 244:12-20.
- [2] Shiadeh M N, Niyayati M, Fallahi S, *et al.* Human parasitic protozoan infection to infertility: a systematic review[J]. *Parasitology Research*, 2016, 115(2): 469-477.
- [3] Pappas G, Roussos N, Falagas M E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis [J]. *International Journal for Parasitology*, 2009, 39(12):1385-1394.
- [4] Li Y, Zhou H. Moving towards improved vaccines for *Toxoplasma gondii*[J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2018,18(3): 273-280.
- [5] Pan M, Lyu C, Zhao J, *et al.* Sixty years (1957-2017) of research on toxoplasmosis in China—an overview[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8:1825.
- [6] Li X L, Wei H X, Zhang H, *et al.* A meta analysis on risks of adverse pregnancy outcomes in *Toxoplasma gondii* infection[J]. *PloS One*, 2014, 9(5): e97775.
- [7] Hill D E, Dubey J P. *Toxoplasma gondii* as a parasite in food: analysis and control[J]. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(4): 1-17.
- [8] Liu Q, Wang Z D, Huang S Y, *et al.* Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*[J]. *Parasites & Vectors*, 2015, 8:292.
- [9] Dubey J P, Darrington C, Tiao N, *et al.* Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from tissues and feces of cats from Addis Ababa, Ethiopia[J]. *The Journal of Parasitology*, 2013, 99: 56-58.
- [10] Khademvatan S, Foroutan M, Hazrati - Tappeh K, *et al.* Toxoplasmosis in rodents: a systematic review and meta-analysis in Iran[J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2017, 10(5): 487-493.
- [11] Atasever A, Babur C, Inci A, *et al.* Experimental toxoplasmosis in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) [J]. *Turkiye Parazitolojii Dergisi*, 2017, 41(2): 62-70.
- [12] Ferra B, Holec-Gasior L, Kur J. Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in farm animals (horses, swine, and sheep) by enzyme-linked immunosorbent assay using chimeric antigens[J]. *Parasitology International*, 2015, 64(5): 288-294.
- [13] Chadwick E A, Cable J, Chinchin A, *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the Eurasian otter (*Lutra lutra*) in England and Wales[J]. *Parasites & Vectors*, 2013, 6: 75.
- [14] Beyhan Y E, Babur C, Yilmaz O. Investigation of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Samsun and Afyon provinces [J]. *Turkiye Parazitolojii Dergisi*, 2014, 38(4): 220-222.
- [15] Zhu C, Cui L, Zhang L. Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of naturally infected dogs and cats[J]. *Iranian Journal of Parasitology*, 2012, 7(3): 89-95.
- [16] Feg V, Sasse J P, Minutti A F, *et al.* *Toxoplasma gondii*: prevalence and characterization of new genotypes in free-range chickens from south Brazil[J]. *Parasitology Research*, 2018, 117(3): 681-688.
- [17] Almeria S, Cabezón O, Paniagua J, *et al.* *Toxoplasma gondii* in sympatric domestic and wild ungulates in the Mediterranean ecosystem.[J]. *Parasitology Research*, 2018, 117(3): 665-671.
- [18] Heddergott M, Frantz A C, Stubbe M, *et al.* Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii*, infection in invasive raccoons (*Procyon lotor*) in Central Europe [J]. *Parasitology Research*, 2017(1): 1-6.
- [19] Zhang X X, Cai Y N, Wang C F, *et al.* Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in stray dogs in northern China[J]. *Parasitology Research*, 2015, 114(12):4725-4729.
- [20] Luo H, Li K, Hui Z, *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in zoo and domestic animals in Jiangxi province, China [J]. *Parasite*, 2017, 24: 7.
- [21] Luo H, Li K, Shahzad M, *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild boars, wild rabbits, and wild chickens in Hubei province, China [J]. *Korean Journal of Parasitology*, 2017, 55(1): 85-88.
- [22] Wu F, Wang Y L, Yang Z, *et al.* Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* in slaughter pigs in Shaanxi province, northwestern China [J]. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 2017, 17(7): 517-519.
- [23] 杨娜, 邢蒙恩, 王大为, 等. 改良凝集试验 (MAT) 与间接血凝试验 (IHA) 对动物血清中弓形虫抗体检测效果的比较 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017, (14): 98-100.

- Yang N, Xing M E, Wang D W, *et al.* The comparison of MAT and IHA for the detection of *Toxoplasma gondii* antibody in serum of animals [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2017, (14): 98-100.
- [24] Patel K K, Howe L, Heuer C, *et al.* Evaluation of Western blot, ELISA and latex agglutination tests to detect *Toxoplasma gondii* serum antibodies in farmed red deer [J]. Veterinary Parasitology, 2017, 244:154-159.
- [25] Oi M, Yoshikawa S, Maruyama S, *et al.* Comparison of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in shelter cats and dogs during 1999-2001 and 2009-2011 in Tokyo, Japan [J]. PLoS one, 2015, 10(8): e0135956.
- [26] Liu Q, Wang Z D, Huang SY, *et al.* Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii* [J]. Parasites & Vectors, 2015, 8: 292.
- [27] Gos M L, Manazza J A, Spath E J A, *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats from two Argentinean provinces [J]. Open Veterinary Journal, 2017, 7(4): 319-322.
- [28] Machacova T, Bartova E, Sedlak K, *et al.* Risk factors involved in transmission of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in rabbit farms in Northern Italy [J]. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 2015, 22(4): 677-679.
- [29] Bartova E, Sedlak K, Kobedova K, *et al.* Seroprevalence and risk factors of *Neospora* spp. and *Toxoplasma gondii* infections among horses and donkeys in Nigeria, West Africa [J]. Acta Parasitologica, 2017, 62(3): 606-609.
- [30] 王艳, 陈永军, 王权, 等. 犬血清弓形虫 IgG 抗体胶体金免疫层析检测试纸条的研制 [J]. 中国兽医科学, 2016, 46(2): 237-241.
- Wang Y, Chen Y J, Wang Q, *et al.* Development of colloidal gold immunochromatography test strips for the detection of immunoglobulin G against *Toxoplasma gondii* infection in canine sera [J]. Chinese Veterinary Science, 2016, 46(2): 237-241.
- [31] 孙雪霏. 猪弓形虫抗体间接 ELISA 方法的建立及胶体金试纸条的制备 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
- Sun X F. Development of an indirect ELISA and a colloidal gold strip for the detection of antibody to *Toxoplasma gondii* in pigs [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016.
- [32] Zhuo X, Sun H, Zhang Z, *et al.* Development and application of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant Mag1 for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* in dogs [J]. The Journal of Parasitology, 2017, 103(3): 237-242.
- [33] 宫枫举, 蒋蔚, 陈永军, 等. 双抗体夹心 ABC-ELISA 检测弓形虫循环抗原方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2017, 49(1): 65-70.
- Gong F J, Jiang W, Chen Y J, *et al.* Establishment of a double antibody sandwich ABC-ELISA method for detection of *Toxoplasma gondii* circulating antigen [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 49(1): 65-70.
- [34] 寇金华. 猪弓形虫感染 ELISA 和胶体金免疫层析试纸条检测方法的建立与初步应用 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- Kou J H. Development and preliminary application of ELISA and colloidal gold immunochromatographic strip for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in swine [D]. Changchun: Jilin University, 2016.
- [35] Liu X C, He Y, Han D G, *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in chicken and soil of chicken farms in Nanjing region, China [J]. Infectious Diseases of Poverty, 2017, 6(1): 62.
- [36] Nabi H, Rashid M I, Islam S, *et al.* Prevalence of *Toxoplasma gondii* oocysts through Copro-PCR in cats at Pet Center (UVAS), Lahore, Pakistan [J]. Journal of the Pakistan Medical Association, 2018, 68(1): 115-118.
- [37] Cong W, Chen L, Shan X F, *et al.* First genetic characterization of *Toxoplasma gondii* infection in donkey meat slaughtered for human consumption in Shandong province, eastern China [J]. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 2018, 61: 1-3.
- [38] Lukasova R, Kobedova K, Halajian A, *et al.* Molecular detection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in birds from South Africa [J]. Acta Tropica, 2018, 178: 93-96.
- [39] Sroka J, Kusyk P, Bilka-Zajac E, *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats from the south-west region of Poland and the detection of T. gondii DNA in goat milk [J]. Folia Parasitologica, 2017, 64.
- [40] Camilo L M, Pereira-Chiocola V L, Gava R, *et al.* Molecular diagnosis of symptomatic toxoplasmosis: a 9-year retrospective and prospective study in a referral laboratory in Sao Paulo, Brazil [J]. The Brazilian Journal of Infectious Diseases: an Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases, 2017, 21(6): 638-647.
- [41] Lass A, Szostakowska B, Korzeniewski K, *et al.* The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental air samples using gelatine filters, real-time PCR and loop-mediated isothermal (LAMP) assays: qualitative and quantitative analysis [J]. Parasitology, 2017, 144(13): 1791-1801.
- [42] Lalle M, Possenti A, Dubey J P, *et al.* Loop-Mediated Isothermal Amplification-Lateral-Flow Dipstick (LAMP-LFD) to detect *Toxoplasma gondii* oocyst in ready-to-eat salad [J]. Food Microbiology, 2018, 70: 137-142.