

分类号：S855.9

授予学位单位代码：10434

学

号：2020120660

山東農業大學

硕士学位论文

猪弓形虫病 ELISA 检测方法的建立及山东部分猪场血清
学调查

Establishment of ELISA Method for Toxoplasmosis and
Serological Investigation of Pigs in Shandong Province

姓 名：刘晓梅

学 位 类 别：兽医硕士

专 业：兽医

研 究 方 向：动物疫病防控

学 院：动物科技学院

指 导 教 师：张晓 副教授

2022年5月30日

论文提交日期: 2022.04.06

论文答辩日期: 2022.05.21

学位授予日期: 2022.06

学位类别: 兽医硕士

答辩委员会主席: 胡莉萍

关于学位论文原创性和使用授权的声明

本人所呈交的学位论文，是在导师指导下，独立进行科学研究所取得的成果。对在论文研究期间给予指导、帮助和做出重要贡献的个人或集体，均在文中明确说明。本声明的法律责任由本人承担。

本人完全了解山东农业大学有关保留和使用学位论文的规定，同意学校保留和按要求向国家有关部门或机构送交论文纸质本和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权山东农业大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文，同时授权中国科学技术信息研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》，并向社会公众提供信息服务。

保密论文在解密后应遵守此规定。

论文作者签名： 刘晓梅

导师签名： 张颖

日期： 2022.05.30

本研究获得以下项目资助

本研究由国家自然科学基金青年项目（31902289），山东省自然科学基金项目（ZR2019BC045）资助。

This work was supported by the Youth Project of the National Natural Science Foundation of China (grant number 31902289) and the project (grant number ZR2019BC045) supported by Shandong Provincial Natural Science Foundation.

符号说明

Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
APS	Ammonium persulfate substitute	过硫酸铵
bp	Base Pair	碱基对
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
d	Day	天
ddH ₂ O	Distilled and Deionized Water	双蒸水
DNA	Deoxyribonucleic Acid	脱氧核糖核酸
dNTP	Deoxyribonucleoside Triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
Fig	Figure	图
FITC	Fluorescein Isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
h	Hour	小时
GST	Glutathione S-transferase	谷胱甘肽转移酶
GRA	Granule antigen	致密颗粒蛋白
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
IFA	Indirect Immol /Autofluorescence Assay	间接免疫荧光试验
IPTG	Isopropyl- β -D-thioacetamide	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
Kana	Kanamycin	卡那霉素
kDa	Kilodalton	千道尔顿
LB	Luria-Bertani Medium	LB 培养基
min	Minute	分钟
mL	Milliliter	毫升
mol/L	Mole/liter	摩尔/升
L	Liter	升
M	Mole	摩尔
MAT	Modified agglutination test	改良凝集试验
mg	Milligram	毫克

OD	Optical Density	光密度
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate Buffer Saline	磷酸缓冲盐溶液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯膜
ROP	Rhoptry protein	棒状体蛋白
Rpm	Revolve per minute	转每分钟
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
μL	Microliter	微升

目 录

中文摘要.....	I
Abstract.....	III
1 前 言.....	1
1.1.1 弓形虫的生物学特征.....	1
1.1.1 弓形虫的概述.....	1
1.1.2 弓形虫病的传播与防治.....	2
1.2 猪弓形虫病的国内外流行情况.....	3
1.3 弓形虫病的诊断方法.....	5
1.4 本研究的目的与意义.....	7
2 材料与方 法.....	9
2.1 试验材料.....	9
2.1.1 主要试验试剂.....	9
2.1.2 主要试验仪器设备.....	9
2.1.3 试验相关溶剂的配制.....	10
2.2 试验方法.....	12
2.2.1 弓形虫的培养.....	12
2.2.2 弓形虫基因组 DNA 的提取.....	12
2.2.3 引物的设计与合成.....	12
2.2.4 SAG1 基因的克隆.....	12

2.2.5 SAG1 蛋白的表达与纯化.....	14
2.2.6 间接 ELISA 检测方法的建立	17
2.2.7 间接 ELISA 检测方法的应用	22
3 结果与分析.....	24
3.1 基因的克隆与表达质粒的鉴定.....	24
3.2 SAG1 蛋白的表达与纯化.....	24
3.2.1 pGEX-6p-SAG1 质粒的最佳表达条件	24
3.2.2 SAG1 蛋白的鉴定.....	25
3.2.3 SAG1 蛋白与血清的特异性识别.....	26
3.3 间接 ELISA 最佳工作条件的确定	26
3.3.1 最佳抗原包被量及抗原包被液的确定	26
3.3.2 最佳抗体稀释液的确定	27
3.3.3 最佳封闭时间的确定.....	28
3.3.4 一抗及酶标二抗孵育时间的确定.....	28
3.3.5 底物最佳反应时间的确定.....	29
3.3.6 判定标准的确定.....	30
3.3.7 批内重复试验和批间重复试验.....	30
3.3.8 与免疫印迹方法和间接荧光抗体方法的对比试验.....	31
3.4 间接 ELISA 检测方法的初步应用.....	32
3.4.1 山东部分地区猪弓形虫病抗体检测结果.....	32
3.4.2 不同种群中猪弓形虫病的检测结果.....	33

3.4.3 不同规模养殖场中猪弓形虫病的检测结果.....	33
4 讨论.....	35
5 结论.....	40
参考文献.....	41
致谢.....	52
攻读学位期间发表论文情况	54

中文摘要

刚地弓形虫是一种专性胞内寄生原虫，可感染包括野生哺乳动物、鸟类、牲畜、家禽和人类在内的多种宿主，是一种危害严重的食源性人畜共患病病原。人类和其他温血动物作为弓形虫的中间宿主，可以通过摄入孢子化卵囊，以及含有包囊的动物组织而感染弓形虫。免疫力正常的成年人感染弓形虫后一般不表现出明显临床症状，孕妇在感染弓形虫后可能会出现流产。猪是弓形虫的易感宿主之一，急性感染的猪会出现高热、咳嗽、呼吸困难、运动障碍以及神经症状等。妊娠母猪感染弓形虫后可通过垂直传播，经胎盘感染胎儿，导致母猪流产、早产、产死胎或者畸形胎，且死亡率较高。中国作为生猪养殖大国，规模化养殖场较多，猪弓形虫病危害严重。因此，建立一种快速准确地检测方法是防控猪弓形虫病流行的重要措施之一。

目前，猪弓形虫病的检测主要是依靠血清学方法，酶联免疫吸附试验（ELISA）是最常见的血清学检测方法之一。弓形虫的膜表面蛋白 1（SAG1）是弓形虫速殖子期的特异性抗原，具有强免疫原性特征，是弓形虫诊断和疫苗研究的重要候选靶标分子。本研究首先筛选了弓形虫适于表达的表面抗原 SAG1 序列（截短），构建了 pGEX-6p-SAG1 原核表达质粒，表达并纯化了重组的 SAG1 蛋白。经鉴定重组的 SAG1 蛋白大小约为 54 kDa，通过 Western Blot 证实重组的 SAG1 蛋白能被猪弓形虫阳性血清特异性识别，随后，我们利用该重组蛋白建立一种检测猪的血清内弓形虫抗体的 ELISA 方法。为了更好的提高 ELISA 检测方法的敏感性和准确性，我们对 ELISA 方法的反应条件进行了优化，通过 P/N 值确定了 ELISA 检测方法的最佳反应条件：SAG1 抗原最佳包被量为 1 $\mu\text{g/mL}$ ；抗原最佳包被液为 0.05 M 碳酸盐缓冲液；最佳封闭时间为 60 min；抗体的最佳稀释液为 3%脱脂奶溶液，稀释度分别为一抗 1:100，二抗 1:4,000；抗体最佳孵育时间为 60 min；底物最佳显色时间为 20 min；结果最佳判定条件为当 OD450nm 值 > 0.56 ，判为阳性；OD450nm 值 ≤ 0.56 ，判为阴性。通过与免疫印迹、间接免疫荧光检测的方法对 ELISA 检测结果进行对比验证，检测结果与间接 ELISA（IgG）检测方法均具有较高的符合率和特异性，表明该检测方法可用于猪弓形虫病的临床诊断，SAG1 可作为一种具有很好诊断价值的弓形虫病诊断抗原。

利用建立的 ELISA 检测方法对山东省 14 个地区收集的共 1,170 份猪的血清样品进行血清学调查, 结果显示山东省不同地区猪弓形虫病平均阳性率为 20.85%, 其中 244 份样品检测结果呈阳性。在山东省 14 个不同地区的发病率在 15.63%到 22.98%之间, 且差异显著。在猪的不同种群中, 妊娠母猪阳性率最高 (25.7%), 其次是繁殖公猪 (22.7%)、后备母猪 (21.1%)、育肥猪 (18.3%) 和仔猪 (17.1%), 母猪感染弓形虫的阳性率明显高于其他猪。不同的饲养规模和养殖条件也是猪弓形虫病阳性率的决定性因素, 其中包括散养户 (25.8%)、大型养殖场 (15.2%) 和小型养殖场 (22.7%)。目前的调查结果显示在山东部分地区养殖场内存在猪弓形虫病较高的流行率态势, 这可能与山东省不同地区的温度、湿度、地理位置、猪场的饲养条件, 养殖环境、猪的年龄种群等有着密切的关系。

综上所述, 本研究建立了一种适用于猪弓形虫病检测的 ELISA 方法, 并利用该方法对山东不同地区猪场收集的血清样品进行血清学 IgG 抗体检测, 其中猪弓形虫病较高的流行率可能与猪场的地理位置、养殖环境等相关。上述试验结果可用于了解山东地区猪弓形虫病的流行情况, 为山东省猪弓形虫血清流行病学研究提供了信息, 有助于猪弓形虫病防控的策略的制定。

关键词: 弓形虫, SAG1, 血清学, ELISA, 猪

Establishment of ELISA method for toxoplasmosis and serological investigation of pigs in Shandong Province

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate, intracellular parasitic protozoan found worldwide. *Toxoplasma gondii* can infect a wide range of hosts including wild mammals, birds, livestock, poultry and human beings, leading to zoonotic toxoplasmosis. Toxoplasmosis is an important food borne parasitic zoonoses. Humans and other warm-blooded animals are its intermediate hosts. Humans can be infected through ingestion of contaminated food and water with oocysts and consumption of undercooked or raw meats containing tissue *T. gondii* cysts. In general, *T. gondii* infections are subclinical or asymptomatic in immunocompetent individuals. However, *T. gondii* infections involving pregnant women induce abortion or fetal developmental disorders. Pigs are one of the susceptible hosts of *Toxoplasma gondii*. Acutely infected pigs develop high fever, cough, dyspnea, motor problems and neurological symptoms. Toxoplasmosis may also be acquired congenitally through transplacental transmission of *T. gondii* to the fetus during pregnancy. *Toxoplasma* infection in pigs has a high mortality rate. Infection of pregnant sows can result in abortion, still birth and birth defects. Thus, we aim to establish a new detection method for more accurate and rapid detection of *T. gondii*.

At present, serological detection is the main method used for epidemiological investigations and diagnosis of toxoplasmosis. The commonly used serological technique is the enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA). *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) is a specific antigen of the tachyzoite stage of *T. gondii* with strong immunogenicity, and is an important candidate molecule for the diagnosis and vaccine research of *T. gondii*. In this study, the suitable surface antigen SAG1 sequence of *Toxoplasma gondii* was screened, the prokaryotic expression plasmid pGEX-6P-SAG1 was constructed, and the recombinant SAG1 protein was expressed and purified. The size of the recombinant SAG1 protein was

identified to be about 54 kDa. Western Blot confirmed that the recombinant SAG1 protein could be specifically recognized by the positive serum of *Toxoplasma gondii*. We used this recombinant protein to establish an ELISA method for detecting toxoplasma antibody in pig serum. In order to improve the sensitivity and accuracy of ELISA method, we optimized the reaction conditions of ELISA method. The optimal reaction conditions were determined by *P/N* value: the optimal coating amount of SAG1 antigen was 1 $\mu\text{g/mL}$. The best coating solution was 0.05 M carbonate buffer. The best sealing time is 60 min. The best diluents of primary antibody and secondary antibody were 3% skim milk solution, and the diluents were 1:100 and 1:4,000, respectively. The optimal incubation time of antibody was 60 min. The optimal color developing time of substrate is 20 min. The best decision result is when OD450nm value > 0.56 , positive; OD450nm ≤ 0.56 was considered negative. The results of ELISA were compared with those of western blotting and indirect immunofluorescence. The results showed high coincidence rate and specificity with those of indirect ELISA (IgG), indicating that this method can be used for clinical diagnosis of toxoplasmosis. SAG1 can be used as a good diagnostic antigen for toxoplasmosis.

The aim of this study was to develop an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using surface antigen protein 1 (SAG1) of *T. gondii* for the diagnosis of porcine toxoplasmosis and to perform a serological investigation of pigs in Shandong province, China. A total of 1,170 serum samples were collected from 14 cities, and 244 of them (20.85%) were positive. In different areas, the prevalence ranged from 15.63% to 22.98%, which had a significant differentiation. Among the different populations, gestating sows had the highest seroprevalence (25.7%), followed by breeding boars (22.7%), replacement gilts (21.1%), fattening pigs (18.3%) and piglets (17.1%). The rearing environment was also a determinant of seroprevalence, including family farmers (25.5%), large farmers (15.2%) and small farms (22.8%). The high prevalence of toxoplasmosis in pig farms in some areas of Shandong province may be closely related to the temperature, humidity, geographical location, breeding conditions, breeding environment and age of pigs in different areas of Shandong

Province.

In conclusion, this study established a rapid, accurate, sensitive ELISA method suitable for many detections. This method was used to detect serological IgG antibody in pig serum samples collected from pig farms in different areas of Shandong province. The high prevalence of *T. gondii* may be related to the location and breeding environment of pig farms. These results can be used to understand the prevalence of toxoplasmosis in pigs in Shandong province. The results provide information for the epidemiological study of *toxoplasma* porcine in Shandong province and contribute to the formulation of prevention and control strategies of toxoplasmosis porcine.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, SAG1, serology, ELISA, pig

1 前言

1.1 弓形虫的生物学特性

1.1.1 弓形虫的概述

刚地弓形虫是一种专性胞内寄生原虫，弓形虫是世界上分布最广泛的寄生虫之一，是一种重要的人畜共患病（Gisbert Algaba *et al.*, 2018）。作为一种单细胞寄生虫，它具有一个较为复杂的生命周期，其宿主范围呈多样性，除人类以外，还包括各种宠物、野生动物、家畜家禽等均易感染弓形虫，猫及猫科动物是弓形虫感染唯一的终末宿主（Deng *et al.*, 2018; Dubey, 2008; Dubey *et al.*, 2012）。据相关数据统计，全球大约有超过 1/3 的人口感染弓形虫病。在以往的研究中，我国对 31 个省、自治区、直辖市进行调查，我国人群弓形虫阳性平均感染率约为 7.9%（Zou *et al.*, 2009; Belluco *et al.*, 2018）。人类血清流行率多年来一直低于世界平均水平，可能是由于独特的饮食和烹饪习惯影响。弓形虫感染主要是通过寄生虫侵染宿主的有核细胞，从而引起宿主体内多种组织、器官等发生损害和病变。一般对于免疫系统正常的人群，感染弓形虫后主要临床症状表现不明显，即宿主终身携带缓殖子虫体而不表现出任何明显临床症状（Weiss *et al.*, 2009）；孕妇在孕期感染弓形虫可能会导致流产、胎儿畸形、胎儿死亡或胎儿患有严重的先天性缺陷，同时相对于免疫力较差的人群，如获得性免疫缺陷综合症患者、妊娠期妇女、抑郁症患者等，感染弓形虫后可致严重的后果，甚至出现死亡（Conrath *et al.*, 2003; Fallahi *et al.*, 2017）。此外，近年来许多研究发现，弓形虫可破坏人的神经系统，甚至与许多精神疾病相关（Alvarado-Esquivel *et al.*, 2015）。感染后主要临床症状表现为运动障碍，感觉异常等（Xiao *et al.*, 2018）。2015 年，弓形虫病被世界卫生组织和联合国粮农组织列为全球第四大食源性寄生虫感染（Torgerson *et al.*, 2015）。

由于弓形虫的宿主范围广泛，弓形虫病在全世界内是影响畜牧业生产的重要问题，尤其妨碍猪、羊等经济动物的生产，并且人类可能会通过摄入生的或未煮熟的肉类从而引发弓形虫的感染，而猪肉是弓形虫感染的主要肉类来源之一（Ottaru *et al.*, 2020）。此外，弓形虫病主要会造成母猪流产、产死胎等，同时也会导致患病的仔猪出现高热、消瘦、死亡等，对于育肥猪、公猪等感染弓形虫可能会与其他疾病混合感染

甚至继发感染造成猪群大规模死亡，严重影响猪的生长繁育，给养猪业造成巨大的经济损失（McAllister, 2005）。

1.1.2 弓形虫病的传播与防治

弓形虫的生活史主要包括速殖子、包囊、卵囊、裂殖体和配子体五个阶段（任庆娥等, 2009）。研究发现弓形虫的生命周期较为复杂，繁殖方式独特，一种是弓形虫在终末宿主体内进行的有性繁殖，另一种是弓形虫在中间宿主体内进行的无性繁殖（Rocha-Roa *et al.*, 2018）。其中，弓形虫的卵囊、包囊两个阶段是该病最重要的传播方式（Su *et al.*, 2019）。科学家们早在 1970 年就已经发现了弓形虫的整个生活史，并且发现弓形虫整个生长繁殖阶段均可在猫科动物的体内完成（Dubey, 2009）。除了猫科动物外，弓形虫还可以自然感染多种温血性中间宿主，从鸟类到人类再到啮齿动物均可发生感染。弓形虫病的感染传播途径主要包括摄入受到弓形虫卵囊污染的土壤、水源、水果或蔬菜，以及摄入生的或者未煮熟的肉类，或者通过垂直传播，造成母婴感染（Dubey, 2009; Dubey *et al.*, 2012）。患病动物和带虫动物都是重要的传染源，人类可以通过环境摄入猫的卵囊，或通过摄入生的或未煮熟的肉中的包囊而感染弓形虫（Pastiu *et al.*, 2019）。此前的研究中很少有通过输血或器官移植从而导致动物的感染（Lopes *et al.*, 2013）。目前，弓形虫主要通过消化道感染，但也可经破损的黏膜、皮肤等感染人类和动物，先天性感染主要经垂直传播感染（AlzahebAl-Amer, 2017）。动物通过各种传播途径摄入的包囊或卵囊的囊壁被肠道中的酶类分解，弓形虫从缓殖子转化为速殖子，以二分裂的形式快速增殖，并经血液或淋巴系统扩散至肺、肝、脾、肾、脑、心脏等全身组织，造成急性感染，感染后弓形虫在中枢神经或肌肉组织中形成包囊，造成终身慢性感染（Baba *et al.*, 2017）。在美国一项旨在探索国内获得性食源性疾病对人类健康整体影响的研究中，弓形虫病对人类健康的影响仅次于非伤寒沙门氏菌（Scallan *et al.*, 2015）。

猪作为易感动物，主要可通过摄入饲料、水或环境中的卵囊等多种方式感染弓形虫（Feitosa *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2015; Hamilton *et al.*, 2015）。欧洲一项研究表明，人类食用包括猪在内的受弓形虫感染的未煮熟的可食用动物被认为是弓形虫通过人类传播的主要途径，并且已从自然感染和试验感染弓形虫的猪的组织 and 肉中分离出活的弓形虫包囊（Swanenburg *et al.*, 2019）。通常弓形虫的感染一年四季均可流行，但

弓形虫病常见于秋季、冬季和早春，动物感染弓形虫后发病率最高，可能是因为当季的各项条件更加适合弓形虫的卵囊生存，例如适宜的温度、湿度等更加适合弓形虫繁殖生长。同时，对于动物而言，寒冷的冬季、车辆运输应激、妊娠、疾病等不同的因素会造成动物机体抵抗力降低（Yan *et al.*, 2016）。据相关文献统计，弓形虫病的流行率与较高的年平均温度和较低的地理纬度有关，随着地理纬度的升高，弓形虫病的阳性率有所增加（Flegr *et al.*, 2014）。其次，养殖场饲养的或周边的流浪猫也被认为是弓形虫感染的一个潜在风险因素（Gebremedhin *et al.*, 2015; Hamilton *et al.*, 2015）。

弓形虫病可引起严重的人畜共患寄生虫病，给公共卫生带来了极大的安全隐患，给养殖产业带来了极大的经济损失。目前国内外对弓形虫的生理特性和侵染特性的研究很全面，但是弓形虫病的治疗仍然是一个严峻的难题。因此，在生活和生产中要采取一系列的措施来防控弓形虫病的发生与感染。针对养殖场内主要依靠相应的预防措施，其中包括养殖场内圈舍环境保持干净卫生，定期对场内进行消毒杀菌；养殖场内禁止养猫，加强圈舍外流浪猫的管理，避免进入场内，防止猫的粪便污染饲料、饮水等，定期进行场内灭鼠，对家畜流产的胎儿及病畜的排泄物、病死的家畜尸体等进行严格的无害化处理（王立新，2020）。目前，能够有效治疗弓形虫病的药物主要包括抗生素类、化学或生物合成药物以及中草药三种类型。针对于养殖场内的猪弓形虫病的治疗主要选择使用人工合成的抗菌药磺胺类药物，同时配合抗菌增效剂等使用效果更佳（杨阳，2022）。由于弓形虫生物学特性较为复杂，目前世界上能够预防和治疗效果很好的弓形虫病的药物和疫苗相对较少，并且弓形虫疫苗更是目前的研发之重。目前我国关于猪弓形虫病的临床诊断、药物治疗以及疫苗研制等很多方面都还有许多尚未解决的问题。针对猪场弓形虫的防控，预防大于治疗，加强养殖场内的管理，果断切断传染源，有效地控制弓形虫感染对提高养猪业的经济生产和保护公共卫生健康都具有非常重要的意义（张居作等，2022）。

1.2 猪弓形虫病的国内外流行情况

猪弓形虫病最早发现是在 1952 年的美国俄亥俄州，在一农场的猪群中爆发了猪弓形虫病，在此之后，多个国家相继发现了猪弓形虫病的存在。早在二十世纪五十年代初期，我国的研究人员就已在猫等动物体内发现了弓形虫，并成功分离出虫体，直到 1977 年时研究人员通过研究证实我国一些地区猪场内猪出现高热现象是由弓形虫感染

引起的（刘靖清等，2010）。我国对弓形虫的研究历史悠久，猪弓形虫病在我国第一次报道至今，我国关于猪弓形虫病的研究已经有四十多年。随着我国养殖业的不断发展，弓形虫病对畜牧业的影响日益加重，弓形虫的研究与防治在我国内颇受重视。

随着各地猪弓形虫病例的不断出现，越来越多的人开始关注猪弓形虫病的相关情况。近年来，世界各地发表了大量关于猪弓形虫病血清学流行调查的研究。尽管许多国家和地区对弓形虫的认识仍然存在差距，但弓形虫在猪中的感染率一直呈现较高水平（Zhang *et al.*, 2020）。弓形虫感染严重威胁猪的健康，猪感染弓形虫后发病率及死亡率可达到 60%以上，特别是母猪繁殖性能受到严重影响，给养猪业繁育生产造成严重损失。根据 1990 年至 2018 年期间发表的涉及全球四十多个国家的相关研究，全球猪的弓形虫病平均流行率估计为 19%，在欧洲猪弓形虫病平均流行率最低为 13%，其中猪弓形虫病平均流行率最高的是非洲（25%）和北美洲（25%），亚洲和南美洲地区的血清平均阳性率分别大约为 21%和 23%（Foroutan *et al.*, 2019）。虽然猪弓形虫病在世界范围内流行，但猪弓形虫病的流行率因国家而异。据统计，巴西猪感染弓形虫病的流行率约为 36%，西班牙育肥猪感染弓形虫病的流行率约为 24.52%，野猪流行率约为 23.8%，英国的流行率约为 7.42%，美国的流行率约为 5.6%~31.0%，西印度群岛的流行率约为 48%，荷兰 2014 年~2016 年猪弓形虫病流行率约为 1.4%~2.8%，日本 2014 年~2018 年野猪弓形虫病平均流行率约为 31.3%~36%（Bamba *et al.*, 2016；Cademartori *et al.*, 2014；Calero-Bernal *et al.*, 2016；Guo *et al.*, 2016；Hamilton *et al.*, 2015；Herrero *et al.*, 2016；Hill *et al.*, 2014；Kobayashi *et al.*, 2021；Swanenburg *et al.*, 2019；Powell *et al.*, 2016）。

近年来，许多学者们报道中国各地的猪弓形虫血清流行率大约在 0%到 76%之间（Zhang *et al.*, 2019）。大多的猪感染弓形虫病都是在出生后因外界因素感染弓形虫（Dubey, 2009）。中国各地猪弓形虫的发病率也各不相同，其中东部发病率约为 18.03%~53.4%，南部约为 27.0%，西南部约为 16.97%~70.0%，东北部约为 4.6%~11.26%，中部约为 24.5%（Jiang *et al.*, 2016；Li *et al.*, 2015；Wang *et al.*, 2016；Wang *et al.*, 2012；Wu *et al.*, 2012；Hou *et al.*, 2018）。中国东北地区猪弓形虫混合感染率约为 20%，明显低于其他地区中国北方地区：40%，西北地区：32%，华东地区：30%，华南地区：35%，华中地区：23%，西南地区：33%（Zhang *et al.*, 2019）。据统计，经酶联免疫吸附试验（ELISA）检测的猪弓形虫病感染混合流行率大

约为 36%，经间接血凝试验（IHA）检验的猪弓形虫病感染的混合流行率大约为 24%，经其他方法检测的猪弓形虫病感染的混合流行率大约为 19%（Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019; Zou *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2015）。由此可见，弓形虫感染在全世界的猪中较为常见，流行范围广。弓形虫在食用生产动物中的感染已成为全世界的一个重要的公共卫生问题。尽管肉类的安全性一直受到严格监控，但人们仍然担心可能通过食用生的或未煮熟的含有弓形虫卵囊的肉类传播寄生虫这一潜在风险。通过改善养殖场内猪群弓形虫的监测，做到预防和诊断相辅相成，这将有助于防止弓形虫在人类和畜禽间的传播。

1.3 弓形虫病的诊断方法

目前，弓形虫感染的明确诊断主要通过寄生虫病原学、免疫学和分子试验来确定，这三种方法各有诊断的优缺点。对于传统的病原学检查主要包括直接镜检、病料接种后分离虫体、卵囊检测、病理组织学及免疫组化试验等。病原学方法虽然具有确诊意义，但操作起来繁琐、检出率较低，故临床实际应用有限。诊断弓形虫分子生物学试验主要包括聚合酶链反应（PCR）、DNA 核酸分子杂交及基因芯片技术等，该方法的标本取材范围较为广泛，相对于特异性与敏感性而言，算是最好的方法之一，但该方法的条件要求高、检测成本较昂贵，不利于大规模养殖场进行方便快捷的检测。免疫学诊断方法主要包括凝集试验（IHA/MAT）、染色试验（Sabin-Feldman DT）、间接免疫荧光抗体试验（IFAT）、酶联免疫吸附试验（ELISA）、免疫胶体金技术、补体结合试验（CFT）等（Beghetto *et al.*, 2006）。其中，间接免疫荧光抗体试验（IFAT）的敏感性较高、特异性强、重复性良好，能够广泛应用于实验室水平的弓形虫诊断，但由于操作复杂、设备条件要求高，不适用于大批量的血清样本的检测。免疫胶体金技术通常操作简便、确诊时间短、重复性好，但目前胶体金技术适用检测的动物种类有限，未来仍需进一步的研究与探索。

随着近年来各地猪弓形虫病例的不断出现，越来越多的人开始关注猪弓形虫病的相关情况。目前，要更加深入地调查猪弓形虫的感染情况，必须有一种能够快速准确检测猪弓形虫抗体的方法。酶联免疫吸附试验（ELISA）方法具有特异性高、敏感性高，便于操作等优点，并且是临床上最为常用的检测方法之一，能够广泛的应用于实际生活中的血清学调查，是世界范围内公认的检测猪弓形虫病的有效手段。ELISA 方

法操作简便，一次试验可以检测多个样本，可以实现样本批量化，适用于大规模的养殖场，应用较为广泛。常见的检测弓形虫 IgG 抗体的方法主要包括染色试验 DT，ELISA，IFAT 和 MAT。间接 ELISA 方法通常用于检测抗体，根据抗体类型的不同，可以检测 IgG、IgM、IgA 三种抗体 (Wu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2020)。IgG 抗体在宿主发生弓形虫感染后 1-2 周就可以出现，1-2 月时 IgG 抗体的量即达到峰值。IgG 抗体在不同个体中下降速度有所不同，有的宿主下降速度快，有些宿主下降速度较慢，但通常在宿主感染弓形虫后可终生在体内保存这种抗体。虽然检测弓形虫感染情况的抗体有几种，但 IgG 抗体的检测尤为重要。传统的 ELISA 方法以弓形虫抗原包被 96 孔 ELISA 板，检测结果与其他免疫学方法如 MAT、IFAT 相比较一致性较高 (Machado *et al.*, 2019)。由于目前仍然没有合适的人类及动物的弓形虫疫苗，所以血清学检测一直被认为是有助于流行病学调查和评估弓形虫感染率的有效方法。

随着分子生物学的进展，从分子水平上，人们对这种专性细胞内寄生原虫的认识不断加深。在目前的研究中弓形虫的膜表面蛋白、棒状体蛋白和致密颗粒蛋白在内的多种虫体蛋白都已经在原核、真核和昆虫细胞中得到表达。其中，膜表面蛋白 1 (SAG1) 具有较强的免疫原性，能够诱导机体产生 IgG、IgM、IgE、IgA 及 sIgA，弓形虫感染后最早出现的且是持续时间较长的抗体之一，相比之下免疫诊断价值更高 (Bokken *et al.*, 2012)。通过基因工程方法获得的重组蛋白基本可获得全部或部分抗原性并能诱导免疫保护力，经纯化后可用作诊断试剂和疫苗，具有良好的应用前景。弓形虫在每个生长阶段都会产生不完全相同的表面抗原，弓形虫表面抗原主要包括：SAG1(P30)、SAG2(P22)、SAG3(P43)、SAG4(P18)、SAG5、BSR(P36)、SRS3(P35) (Cleary *et al.*, 2002)。SAG1 是一个很重要的抗原蛋白，只存在于速殖子表面，缓殖子和包囊表面则不存在 (Jung *et al.*, 2004)。除此之外，SAG1 还可以诱导宿主产生免疫应答反应，具有很好的抗原性与免疫原性 (Gruenbergvan der Goot, 2006)。在 1983 年对该蛋白进行分离鉴定，发现 SAG1 蛋白占虫体总蛋白的 3%-5%，SAG1 蛋白的组成主要包含 336 个氨基酸残基，SAG1 基因为单拷贝，长度大约含 1.1 kbp，分子量大小约为 30 kDa，不含内含子 (Zhang *et al.*, 2007)。在过去的 10 多年间，国内外各个实验室表达出了大量的重组蛋白，其中包括 ROP1、ROP2 (弓形虫棒状体蛋白)，SAG1、SAG2 (表面膜蛋白)，以及 GRA1、GRA2、GRA6、GRA7 (弓形虫致密颗粒蛋白) 等 (Song *et al.*, 2013)。目前，已经报道的可以作为弓形虫诊断抗原研究应用

的蛋白有 SAG1、MIC3、ROP2、GRA1、GRA6、GRA7、SAG1-ROP2、SAG1-MIC3 等蛋白, 利用这些重组蛋白进行不同动物样品的弓形虫抗体检测, 并且重组蛋白的使用结果表明均具有良好的检测效果 (LauFong, 2008; Pietkiewicz *et al.*, 2006)。

本研究中我们选择了表面抗原 1 (SAG1, 又称为 P30) 作为包被抗原, 因为它是一种高度丰富的表面蛋白, 在快速分裂的速殖子上表达, 并且它是最具有免疫原性和分期特异性的弓形虫抗原之一。此外, SAG1 被认为是开发有效诊断试剂的重要的候选材料之一, 作为最主要的抗原, 可用于基于抗体的检测 (Majidiani *et al.*, 2020)。故本研究利用 SAG1 蛋白作为抗原, 以建立一套标准实用的猪弓形虫病 ELISA 血清学抗体检测方法, 通过血清学检测方法进行猪弓形虫病流行率的调查, 这将有助于改善管理和减少潜在的人类接触来预防和控制弓形虫的传播。

1.4 本研究的目的是与意义

随着各地猪弓形虫病例的不断出现, 越来越多的人开始关注猪弓形虫病的相关情况。弓形虫病对生猪养殖产业造成很大的威胁, 该病的防控对养殖业十分重要。弓形虫病作为危害严重的人畜共患病之一, 近几年, 全球人感染弓形虫病的情况较为多见。免疫功能正常情况下人类感染弓形虫后无明显临床症状, 部分感染者可引起淋巴结病或出现类似流感症状, 或导致眼部疾病 (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2007)。而在免疫功能低下的患者中, 弓形虫感染可能是致命的。孕妇是弓形虫感染的高风险群体, 如果感染是在怀孕期间获得的, 这可能会导致流产、死产、胎儿出现神经系统疾病等。随着经济的不断提高, 养殖业的不断扩大, 猪的数量逐渐增加, 猪肉是人类的主要肉类消费品。据估计, 来自六个欧洲大城市感染弓形虫的孕妇有 30%-63%是由肉类感染引起的 (Deng *et al.*, 2018)。更重要的是, 世界各地已经记录了几项与食用受感染猪肉有关的人类弓形虫病的研究 (Vitale *et al.*, 2014)。此外, 大部分猪主要通过摄入污染的环境中的弓形虫卵囊而感染, 猪感染弓形虫病后在监测环境中弓形虫卵囊污染程度方面发挥重要作用及公共卫生意义。

山东省一直是我国的养猪大省, 但是目前对山东省的猪弓形虫病的感染情况的调查研究较少, 本研究利用弓形虫重组蛋白 SAG1 作为包被抗原, 建立一种快速、准确地可用于猪弓形虫病诊断的间接 ELISA 检测方法, 对山东省部分地区的猪血清样品进行血清学抗体检测, 可用于监测山东省不同地区的猪弓形虫感染情况, 获得相应猪场

猪群弓形虫感染数据。本次关于山东省部分地区猪弓形虫病的流行情况调查，可以了解山东省部分地区的猪弓形虫病的流行情况，其中包括不同地区、种群以及不同规模养殖场的猪弓形虫病的情况，分析山东省部分地区的猪弓形虫病的流行情况和流行特点，可以有效降低山东省人群和养猪行业中的弓形虫发病率，丰富我省弓形虫的流行病学资料，为进一步研究及制定科学的防治对策提供依据。

2 材料与amp;方法

2.1 试验材料

2.1.1 主要试验试剂

表 1 主要试验试剂
Table 1 The main reagents

试剂名称	购买公司
氨苄青霉素 (Amp)	碧云天生物技术有限公司
DMEM	Gibco
彩色预染蛋白 Marker	Thermo
Trypsin-EDTA	MACGENE
卡那霉素 (Kan)	碧云天生物技术有限公司
蛋白酶抑制剂	碧云天生物技术有限公司
普通质粒提取试剂盒	南京诺唯赞生物技术科技有限公司
DNA 回收试剂盒	南京诺唯赞生物技术科技有限公司
单片段同源重组酶	南京诺唯赞生物技术科技有限公司
DNA Marker	南京诺唯赞生物技术科技有限公司
PVDF 膜	Millipore 德国
核酸染料	索莱宝科技有限公司
蛋白浓度检测试剂盒	碧云天生物技术有限公司
高纯度质粒 DNA 小量提取试剂盒	北京艾德莱生物技术有限公司
基因组 DNA 提取试剂盒	北京康为世纪科技有限公司
谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 4B (GST 标签纯化树脂)	索莱宝科技有限公司
HRP-兔抗猪 IgG (H+L)	北京博奥龙免疫技术有限公司
可溶性单组分 TMB 底物溶液	天根生化科技 (北京) 有限公司
无水乙醇、氯化钠、氯化钾、甲醇等	天津市凯通化学试剂有限公司

2.1.2 主要试验仪器设备

表 2 仪器设备
Table 2 Instrument and equipment

试剂名称	购买公司
-80℃超低温冰箱	Thermo 科技公司
制冰机	常熟市雪科电器有限公司
-20℃低温冰箱	海尔集团有限公司
水平摇床	北京市六一仪器厂, 中国
常温离心机	Eppendorf 有限公司

空气恒温摇床	上海博彩科技有限公司, 中国
低温高速离心机	安徽省嘉文仪器装备有限公司, 中国
WH-861 型涡旋振荡器	华利达实验设备公司
高压蒸汽灭菌器	日本三洋科技有限公司
PB-10 型 PH 计	德国 Sartorius
电热鼓风干燥箱	上海一恒科学仪器有限公司, 中国
DYYnl-2 型电泳仪	Bio-Rad, 美国
凝胶成像系统	天能仪器有限公司, 中国
核酸电泳仪	Bio-Rad, 美国
普通 PCR 仪	TaKaRa
移液枪	Eppendorf 有限公司
酶标仪	Bio-Rad 公司, 美国
荧光倒置显微镜	江南永新, 中国
电子天平	宁波新芝有限公司, 中国
超声波清洗器	上海一恒科学仪器有限公司, 中国
超纯水仪	Millipore
SW-CJ-2FD 型超净工作台	苏净安泰有限公司, 中国
生物安全柜	力新仪器(上海)有限公司, 中国
4°C 立式冷藏陈列柜	星星集团有限公司
恒温振荡器	常州普天仪器制造有限公司, 中国

2.1.3 试验相关溶剂的配制

表 3 主要的试剂配制方法

Table 3 Main reagent preparation method

试剂名称	配制方法
LB 液体培养基 (200 mL 体系)	称量 2 g NaCl, 2 g Tryptone, 1 g Yeast Extract, 先用量筒量取 150 mL 去离子水, 完全溶解后定容至 200 mL, 121°C, 灭菌 15 min。
LB 固体培养基 (200 mL 体系)	称量 2 g NaCl, 2 g Tryptone, 1 g Yeast Extract, 3 g Agar powder, 先用量筒量取 150 mL 去离子水, 完全溶解后定容至 200 mL, 121°C, 灭菌 15 min。灭菌结束后使其降温至 50°C 倒板, 将固体板放于 4°C 冰箱保存。
0.01M PBS 缓冲液	分别称取 NaCl、KCl、Na ₂ HPO ₄ 、KH ₂ PO ₄ 置于烧杯中, 量取去离子水 900 mL, 将称取得药品和去离子水混合, 放置于磁力搅拌器, 进行搅拌使试剂充分溶解, 将 pH 调至 7.4, 然后将溶液定容至 1 L, 倒入洁净的试剂瓶中, 进行高压灭菌后备用。
5×Tris-Glycine Buffer (SDS-PAGE 电泳缓冲液)	称量 Tris、Glycine、SDS 三种试剂, 加入约 800 mL 的去离子水, 搅拌使试剂完全溶解, 最后加去离子水将溶液定容至 1 L, 室温保存备

	用。
异丙基-β-D-硫代半乳糖 (ITPG)	在 4.196 mL 灭菌后的蒸馏水中加入 1g IPTG 搅拌溶解, 用 0.22 μm 的滤膜除菌, 分装到 2 mL EP 管中, 终浓度为 1 M, 储存于 -20°C 冰箱备用。
50×TAE Buffer (1 L 体系)	称量 242 g Tris, 37.2 g Na ₂ EDTA.2H ₂ O 倒入 1 L 体积烧杯中, 完全溶解后, 加入 57.1 mL HAC 定容至 1 L, 室温保存。
1%琼脂糖凝胶 (30 mL 体系)	称量 0.3 g 琼脂糖粉末倒入锥形瓶中, 加入 1 mL 50×TAE Buffer, 量取 29 mL 去离子水加入锥形瓶中, 至于微波炉中加热至胶完全溶解。放凉至加入 5 μL 核酸染色剂, 摇匀后倒入插好梳子的胶托内, 室温凝固 30 min 后使用。
12%蛋白分离胶	ddH ₂ O 6.6 mL、30%丙烯酰胺 8 mL、1.5 mol/L pH= 8.8 的 Tris-HCl 5 mL、10%SDS 0.08 mL、10%APS 0.08 mL、TEMED 0.008 mL。
5%蛋白积层胶:	ddH ₂ O 5.5 mL、30%丙烯酰胺 1.3 mL、1.0 mol/L pH= 6.8 的 Tris-HCl 1.0 mL、10%SDS 0.2 mL、10%APS 0.2 mL、TEMED 0.008 mL。
SDS-PAGE 染色液 (1 L 体系)	称量 1 g 考马斯亮蓝 R-250 倒入 300 mL 去离子水中, 分别量取 100 mL 冰醋酸, 250 mL 甘油倒入烧杯中, 完全溶解后, 定容至 1 L, 滤纸过滤, 室温保存。
SDS-PAGE 脱色液 (1 L 体系)	用量筒量取 500 mL 甲醇倒入 1 L 体积烧杯中, 加入 100 mL 冰醋酸, 定容至 1 L, 室温保存。
TBST Buffer (1 L 体系)	称量 8.8 g NaCl 倒入 1 L 体积烧杯中, 量取 20 mL 1 M pH= 8.0 的 Tris-HCl, 吸取 0.5 mL Tween-20, 分别加入烧杯中, 完全溶解后, 定容至 1 L, 室温保存。
Western 封闭液 (10 mL 体系)	称量 0.5 g 脱脂奶粉倒入 15 mL 离心管内, 吸取 10 mL TBST Buffer 于离心管使其溶解, 现用现配。
Binding buffer (10 mL 体系)	称量 0.22 g NaCl 倒入 15 mL 离心管内, 吸取 10 μL PMSF 加入离心管内, 先加入 8 mL 1×PBS 使其完全溶解, 定容至 10 mL。
Washing buffer (10 mL 体系)	称量 0.22 g NaCl 倒入 15 mL 离心管内, 吸取 10 μL PMSF 加入离心管内, 先加入 8 mL 1×PBS 使其完全溶解, 定容至 10 mL。
Elution buffer (10 mL 体系)	称量 0.61464 g 谷胱甘肽 (还原型) 倒入 15 mL 离心管内, 吸取 10 μL PMSF 加入离心管内, 先加入 8 mL 1×PBS 使其完全溶解, 定容至 10

	mL。现用现配。
2M H ₂ SO ₄ 溶液	用量筒量取 22.2 mL 硫酸溶液倒入 177.8 mL 体积的去离子水中，室温保存。
0.05M 碳酸盐抗原稀释液	称量 2.93 g NaHCO ₃ ，1.59 g Na ₂ CO ₃ ，溶解在 900 mL 蒸馏水的烧杯中，完全溶解后，室温保存。
PBST 洗液（1 L 体系）	将配好的 0.01 M PBS 缓冲溶液放于烧杯中，吸取 0.5 mL Tween-20，搅拌使试剂完全溶解，定容至 1L，倒入干净的广口瓶中，现配现用。

2.2 试验方法

2.2.1 弓形虫的培养

以 Vero 细胞接种弓形虫，培养 48 h~64 h，每日观察虫体增殖情况，在虫体大量释放前收集弓形虫速殖子。

2.2.2 弓形虫基因组 DNA 的提取

按基因组提取试剂盒（南京诺唯赞生物科技有限公司）说明书具体步骤进行试验操作。

2.2.3 引物的设计与合成

通过 ToxoDB 网站(www.toxodb.org)、Expasy 网站(www.expasy.ch/tools/)、DNA Star 软件及相应文献报道设计同源重组引物序列，序列合成则由上海生工完成，按合成引物的 OD 值以双蒸水溶解引物，稀释为储存浓度：10 μM，分装后于 -20℃ 冻存。

表 4 SAG1 引物列表

Table 4 List of SAG1 primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')
SAG1-F	TCGGATCCCCCTCTTGTTGC
SAG1-R	AGCCGATTTTGCTGACCCTG

2.2.4 SAG1 基因的克隆

2.2.4.1 SAG1 基因的 PCR 扩增

根据 pGEX-6p-1 载体序列设计同源重组引物序列 (表 6), 序列的合成则由上海生工完成。用提取得到的弓形虫 RH 株 cDNA 为模版, 利用相应的引物进行基因片段的扩增, PCR 反应体系如下:

表 5 高保真酶加样体系 (50 μ L)
Table 5 High-fidelity enzyme loading system (50 μ L)

组分	添加量
2.5 mmol/L dNTPs	5 μ L
10 \times EasyPfu Buffer	5 μ L
Forward Primer (10 μ m)	1 μ L
Reverse Primer (10 μ m)	1 μ L
cDNA 模板	2 μ L
EasyPfu DNA Polymerase	1 μ L
ddH ₂ O	Up to 50 μ L

表 6 pGEX-6p-1 载体线性化同源重组引物
Table 6 pGEX-6p-1 vector linearized homologous recombination primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')
pGEX-6p-1-F	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pGEX-6p-1-R	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG

提取弓形虫的 cDNA 为模板, *SAG1-F*、*SAG1-R* 为上下游引物, 对 *SAG1* 基因进行 PCR 扩增。加样体系如下 (表 7):

表 7 单片段重组加样体系 (10 μ L)
Table 7 Single fragment recombination loading system (10 μ L)

组分	添加量
线性化载体	X μ L
插入片段	Y μ L
5 \times CE II Buffer	2 μ L
Exnase II	1 μ L
ddH ₂ O	up to 10 μ L

加样结束后, 瞬离 5 s 以确保样品完全沉于管底。离心后放入 PCR 仪内进行扩增, 扩增条件见 (表 8)。4 $^{\circ}$ C 可进行短时间保存, 时间久会对仪器造成损耗。反应结束后应尽快拿出反应产物。扩增时间因酶的不同、基因长度的不同而长短不一。

表 8 反应体系
Table 8 reaction system

步骤	温度 (°C)	时间
预变性	95	10 min
变性	95	30 s
退火 (30 个循环)	55	30 s
延伸	72	2 min
总延伸	72	10 min
保存	4	+∞

2.2.4.2 重组表达质粒 pGEX-6p-1-SAG1 的构建与鉴定

经琼脂糖凝胶电泳鉴定后，将条带大小正确的 PCR 片段进行切胶回收，胶回收步骤按照 PCR 产物回收试剂盒具体操作进行。将回收产物与载体进行连接，将连接产物转化至大肠杆菌克隆感受态细胞，放置金属浴 42°C 热激 90 s，加入不含抗生素的 LB 液体培养基，放置 37°C 摇床内摇菌 1 h，将菌液均匀涂布在含有氨苄青霉素抗性的 LB 平板上，37°C 培养箱倒置培养。挑取单个菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，放置摇床 37°C 过夜培养，然后参照质粒小量提取试剂盒说明书具体操作提取质粒，以所提质粒为模板，进行 PCR 鉴定，用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，观察结果。选择阳性质粒进行测序鉴定，按照序列分析软件对测序结果进行序列分析比对，用测序正确的质粒菌液进行质粒提取，即获得重组质粒 pGEX-6p-SAG1。

2.2.5 SAG1 蛋白的表达与纯化

2.2.5.1 重组表达质粒 pGEX-6p-SAG1 最佳诱导条件的优化

将上述制备的 pGEX-6p-SAG1 原核表达质粒转入大肠杆菌表达型感受态 BL21 中，37°C 过夜培养 12 h~14 h 后，挑取单个阳性单菌落接种于 5 mL 含氨苄抗性的 LB 培养基中培养。为获得 pGEX-6p-SAG1 质粒最佳的诱导表达条件，以此上述为基础继续培养数管菌液，每管菌液 8 ml。吸取 2 mL 菌液作为未诱导样本，向每管菌液中加入不同浓度的 IPTG，培养基 IPTG 终浓度分别为 0.1 mM、0.3 mM、0.5 mM 及未加 IPTG 的空白对照组在温度为 16°C、22°C、37°C 中分别培养 2 h、4 h、8 h、12 h、18 h，进行质粒表达最适宜的诱导浓度、最佳诱导温度和最佳诱导时间的摸索，通过 SDS-PAGE 分析蛋白的表达量，确定蛋白表达最佳的诱导温度、IPTG 诱导浓度及诱导时间。

2.2.5.2 重组融合蛋白的大量诱导表达

在确定了最适的 IPTG 诱导浓度与最佳诱导时间，按最佳诱导条件诱导大肠杆菌，将菌液按照 1:1,000 的比例加入 400 mL 的氨苄抗性液体培养基中进行菌液的培养，观察菌液浑浊情况，当菌液的 OD_{600nm} 值达到 0.6~1.0 时，加入最佳诱导浓度 0.5 mM 的 IPTG，放置 22°C 摇床进行摇菌，进行菌株 400 mL 的大量培养，诱导培养至最佳诱导时间 5 h 后，放置离心机 4°C、8,000 rpm 离心 10 min，超声裂解菌体沉淀，收集裂解后的菌体，放置 -20°C 储存备用。

2.2.5.3 重组融合蛋白 SAG1 的纯化与鉴定

(1) 将 GST 标签纯化树脂吸取 2 mL 到纯化柱内。打开纯化柱开关流出保存树脂的 20%乙醇，用过滤后的去离子水反复冲洗 5 次，使纯化柱内的乙醇完全清除。

(2) 用提前配制并过滤好的 PBS (PH: 8.0, 已加 NaCl/PMSF) 冲洗纯化柱 5 次，使纯化柱内环境保持平衡。加 5 mL Binding buffer，上下轻轻摇晃使其充分结合，放置 4°C，结合 30 min。

(3) 拿出上述超声保存于 -20°C 的蛋白使其在冰上完全融化，加入到纯化柱内用滤器进行过滤。打开开关使柱中的 Binding buffer 缓慢流出。将过滤后蛋白加入柱子内，放置 4°C 摇床，过夜结合 (16 小时)。

(4) 充分结合后，打开开关使其流速为 1 min 6 滴，收集蛋白流穿液。蛋白流穿 3 次，使用考马斯亮蓝检测直至考马斯亮蓝不变蓝色。

(5) 将配置好的 Washing buffer 过滤进行杂蛋白的洗涤，洗涤 7-8 次，同样使用考马斯亮蓝检测直至考马斯亮蓝不变蓝色。

(6) Elution buffer 现配现用，过滤后加入柱内洗脱蛋白，放置 4°C，结合 40 min。

(7) 充分结合后，打开开关使其流速为 1 min 6 滴，收集蛋白洗脱液。

(8) 将透析袋剪好小心放入盛有过滤后 ddH₂O 的 50 mL 离心管内，沸水煮 10 min。降温后将蛋白收集液吸入透析袋内。两头开口处用夹子固定好，放在玻璃平皿内，将盛有透析袋的玻璃平皿置于碎冰上，把 PEG 20,000 固体放在透析袋及平皿内，使其覆盖，缓慢透析。浓缩至适当的体积后，小心收集浓缩蛋白液，放置 -80°C

保存备用。

(9) 处理谷胱甘肽-琼脂糖亲和层析柱 (GST 标签纯化树脂): 先用过滤后的 PBS 进行冲洗, 冲洗 5-8 次, 再用过滤后的去离子水冲洗, 冲洗 5-8 次, 接着用提前配置好的 3 mol/L NaCl 缓冲液冲洗 5 次, 进行树脂的再生。接下来用过滤后的超纯水冲洗 8 次, 并用过滤后的 20%乙醇冲洗 5 次, 最后加入 5 mL 20%乙醇, 放置 4°C 冰箱保存。

(10) 吸取浓缩后的目的蛋白 10 μ L 到 EP 管中, 加入 30 μ L PBS, 10 μ L 5 \times 蛋白上样缓冲液, 放置水中沸腾后煮 10 min, 12,000 rpm, 离心 3 min。

(11) 配置 12%的分离胶 20 mL, 加上配置好的液体后 60 min 待其凝固, 配置 5%的积层胶 8 mL (用超纯水配置), 加上配置好的液体后 40 min 待其凝固。

(12) 待胶体凝固后小心拔下蛋白胶上的梳子, 将处理好的蛋白按照顺序小心加入胶孔中。

(13) 按照 SDS-PAGE 常规操作步骤, 50 V 电压恒压跑胶, 5 h 后停止。

(14) 电泳结束后, 将蛋白胶切下放入考马斯亮蓝染液中, 置于摇床染色 4 h-6h。

(15) 染色结束后倒掉考马斯亮蓝染液, 加入脱色液进行蛋白胶脱色, 脱色数小时后蛋白胶上的条带清晰可见, 根据蛋白条带的大小确认目的蛋白的纯度。

2.2.5.4 SGA1 蛋白的 Western Blot 鉴定

(1) 吸取浓缩后的目的蛋白 10 μ L 到 EP 管中, 加入 30 μ L PBS, 10 μ L 5 \times 蛋白上样缓冲液, 放置水中沸腾后煮 10 min, 12,000 rpm, 离心 3 min。

(2) 配置 12%的分离胶 20 mL, 加上配置好的液体后 60 min 待其凝固, 配置 5%的积层胶 8 mL (用超纯水配置), 加上配置好的液体后 40 min 待其凝固。

(3) 待胶体凝固后小心拔下蛋白胶上的梳子, 将处理好的蛋白按照顺序小心加入胶孔中。

(4) 按照 SDS-PAGE 常规操作步骤, 50 V 电压恒压跑胶, 5 h 后停止。

(5) 电泳结束后, 准备好转膜仪。取出蛋白胶先放入转膜液中, 按蛋白胶尺寸大

小裁剪 PVDF 膜，将 PVDF 膜放置盛有甲醇溶液的玻璃平皿中，PVDF 膜放入甲醇溶液中起到活化作用。

(6) 按照“胶在负，膜在正”的常规操作原则进行转膜。250 mA，转膜 1 h。

(7) 转膜结束后，将膜放入到玻璃平皿里用 TBST Buffer 洗 8 遍，每次 5 min。去除转膜液。

(8) 将 PVDF 膜放置于 5%的脱脂奶封闭液中，在 37°C 恒温箱封闭 1h。

(9) 按照 1:500 的比例用 5%的脱脂奶封闭液稀释一抗抗体。将 PVDF 膜放置稀释好的抗体中 37°C，1 h 进行孵育。

(10) 孵育结束后，将膜放入到玻璃平皿里用 TBST Buffer 洗 8 遍，每次 5 min。

(11) 按 1:4,000 的比例用 5%的脱脂奶溶液稀释二抗。将 PVDF 膜放置稀释好的抗体中 37°C，1 h 进行孵育。

(12) 孵育结束后，将膜放入到玻璃平皿里用 TBST Buffer 洗 8 遍，每次 5 min。

(13) 将显影液按照 A 液:B 液=1:1 比例稀释好。将 PVDF 膜放入到显影仪里，加入显影液，按照仪器说明书操作进行显影，观察是否出现预期大小蛋白条带。

2.2.5.5 重组融合蛋白的浓度测定

按照蛋白浓度测定操作步骤说明，对重组融合蛋白进行蛋白浓度的测定。在酶标板上每孔先加入 18 μL PBS，再加入浓缩后的 2 μL 蛋白，加入 200 μL 考马斯亮蓝溶液，每个样品每次平行做 3 孔，每组设两个空白对照，酶标仪测定 $\text{OD}_{595\text{nm}}$ 值后取其平均值，按相应的公式计算样品中的蛋白质含量。

2.2.6 间接 ELISA 检测方法的建立

2.2.6.1 最佳 ELISA 方法工作条件的优化

为了确定检测方法最佳的 ELISA 工作条件，通过固定间接 ELISA 操作步骤中其他条件，变动需要确定的条件，根据 P/N 原则逐步确定 ELISA 方法的抗原包被液、抗体稀释液、抗原包被量、封闭液及封闭时间、抗体孵育条件、显色时间等，以建立最佳的间接 ELISA 标准条件。

参考相关文献及国内外商业化试剂盒的使用说明书，初步确定间接 ELISA 方法的

基本操作过程如下:

包被: 将抗原用 0.05 M pH9.6 碳酸盐缓冲液稀释后,包被 96 孔聚苯乙烯微量反应板,每孔加样 100 μL , 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜 (至少 16 h)。

洗涤: 甩干孔内的反应液, 用提前配置好的洗涤液进行洗涤, 将洗涤液注满每板 96 孔后, 即甩去。加入 300 μL 洗涤液浸泡, 间歇震动 ELISA 板, 甩去孔内液体, 在吸水纸上轻轻拍干, 重复洗涤 5 次, 每次 2 min~3 min。

封闭: 每孔加入 100 μL 的封闭液, 放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中, 封闭孵育 1 h。

加样: 用样品血清稀释液将待检血清作 1:100 稀释,每孔加样 100 μL 。以阳性标准血清、阴性标准血清作为参考, 分别加样至孔内, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱作用 1 h, 每板设置空白对照组。

洗涤: 孵育结束后, 加入 300 μL 洗涤液进行洗涤, 具体操作步骤同上述洗涤。

加酶标二抗: 用抗体稀释液将酶标二抗作 1:4,000 倍稀释, 每孔加样 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 1 h。

洗涤: 孵育二抗结束后, 加入 300 μL 洗涤液, 具体操作步骤同上述洗涤。

显色: 每孔加入 TMB 底物显色液 100 μL , 放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱, 避光显色 20 min。

终止反应: 每孔加终止液各 100 μL , 轻轻震荡 ELISA 板, 反应充分结合。

酶标仪测定: 使用酶标仪在在波长 450 nm 处进行测定, 读取每孔的吸光度值。每个样品每次平行做 3 孔,取其 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 数值的平均值。

2.2.6.2 酶标板的选择

间接 ELISA 标准化的关键因素之一是对酶标板的选择。良好的酶标板需要具有很好的吸附性, 空白值较低, 每板每孔的透明度较高, 每板、每孔之间的性能较一致。选择性能较好的 ELISA 板, 能在检测中减少对检测结果数值的影响。

2.2.6.3 ELISA 抗原包被量及抗原包被液的优化

用 SAG1 蛋白进行抗原包被, 摸索 SAG1 抗原作用的最佳包被量。包被量由 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 逐渐增为 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.3 μg 、0.5 μg 、1 μg 、1.5 μg) 确定 SAG1 抗原作用的最

佳包被量。选择 PBS (0.01 M, pH 7.4)、0.05 M 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 作为包被缓冲液, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SAG1 抗原量包被 ELISA 板。每次反应均设置阴阳性对照, 每个条件作三孔重复, 按照间接 ELISA 的具体操作进行, 确定最佳抗原包被缓冲液。

表 9 抗原包被液的选择

反应条件	阳性血清/阴性血清
抗原	SAG1 蛋白
包被液	PBS 溶液 0.05 M 碳酸盐缓冲液
抗原包被量	0.3 μg 、0.5 μg 、1 μg 、1.5 μg
其他反应条件	4°C 过夜包被 16 h, 阳性血清和阴性血清稀释度 1:100 二抗稀释度 1:4,000, 底物反应时间 20 min
判定	测定 OD _{450nm} , 选取阴性血清 OD _{450nm} (N) 在 0.5 左右, 阳性血清 OD _{450nm} (P) 值在 1 左右, 且 P/N 比值最大的一组作为最佳条件

2.2.6.4 抗体稀释液的优化

以 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗原量包被 ELISA 板, 分别选择 PBS 溶液 (0.01 M, pH7.4)、3% 脱脂奶溶液作为备选的抗体稀释液, 确定最佳抗体稀释液。

表 10 抗体稀释液的选择

反应条件	阳性血清/阴性血清
抗原	SAG1 蛋白
包被液	0.05 M 碳酸盐缓冲液
血清	猪弓形虫阳性血清/ 阴性血清
抗体稀释液	PBS (0.01 M, pH 7.4)、3% 脱脂奶溶液
其他反应条件	4°C 过夜包被 16 h, 阳性血清和阴性血清稀释度 1:100 二抗稀释度 1:4,000, 底物反应时间 20 min
判定	测定 OD _{450nm} , 选取阴性血清 OD _{450nm} (N) 在 0.5 左右, 阳性血清 OD _{450nm} (P) 值在 1 左右, 且 P/N 比值最大的一组作为最佳条件

2.2.6.5 封闭时间的优化

以最佳抗原包被量 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗原量包被 ELISA 板, 选择 3% 脱脂奶溶液作为封闭液, 37°C 下分别封闭 30 min、60 min、90 min、120 min, 通过检测结果确定最佳的封闭时间。

表 11 封闭时间的选择

Table 11 Determination of sealing fluid and sealing time

反应条件	阳性血清/阴性血清
包被液	0.05 M 碳酸盐缓冲液
血清	猪弓形虫阳性血清/ 阴性血清
抗体稀释液	3%脱脂奶溶液
封闭液	3% 脱脂奶溶液
封闭时间	30 min、60 min、90 min、120 min
其他反应条件	阳性血清和阴性血清稀释度 1:100 二抗稀释度 1:4,000, 底物反应时间 20 min
判定	测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$, 选取阴性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ (N) 在 0.5 左右, 阳性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ (P) 值在 1 左右, 且 P/N 比值最大的一组作为最佳条件

2.2.6.6 一抗及酶标二抗孵育时间的优化

以 SAG1 最佳抗原包被 ELISA 微孔板, 3%脱脂奶封闭 1h, 一抗稀释度为 1:100, 二抗稀释度为 1:4,000。血清孵育时间分别设为 30 min、60 min、90 min, 确定最佳的封闭时间。以 SAG1 最佳抗原包被 ELISA 微孔板, 3%脱脂奶封闭 1 h, 分别以 3%脱脂奶稀释血清及酶标二抗, 一抗稀释度为 1:100, 二抗稀释度为 1:4,000。血清孵育时间设为 60 min, 二抗孵育时间分别设为 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 依据 P/N 值确定最佳的孵育条件。

表 12 血清孵育时间的确定

Table 12 Determination of the incubating time of serum

反应条件	阳性血清/阴性血清
包被液	0.05 M 碳酸盐缓冲液 4°C 过夜包被
抗体稀释液	3%脱脂奶溶液, 血清稀释度 1:100; 二抗稀释度 1:4,000
封闭液	3%脱脂奶溶液封闭 60 min

一抗反应时间	30 min、60 min、90 min
二抗反应时间	30 min、45 min、60 min、90 min
底物显色条件	底物反应时间 20 min
判定	测定 OD _{450nm} ，选取阴性血清 OD _{450nm} (N) 在 0.5 左右，阳性血清 OD _{450nm} (P) 值在 1 左右，且 P/N 比值最大的一组作为最佳条件

2.2.6.7 底物反应时间的优化

以 SAG1 最佳抗原包被 ELISA 微孔板，3%脱脂奶封闭 1 h，分别以 3%脱脂奶稀释血清及酶标二抗，一抗稀释度为 1:100，二抗稀释度为 1:4,000，分别 37°C 孵育 60 min。底物反应时间分别设为 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min，依据 P/N 值从而确定最佳底物反应时间。

表 13 底物反应时间的确定

Table 13 Condition of substrate of recombinant protein

反应条件	阳性血清/阴性血清
包被液	0.05 M 碳酸盐缓冲液 4°C 过夜包被
抗体稀释液	3%脱脂奶溶液，血清稀释度 1:100；二抗稀释度 1:4,000
封闭液	3%脱脂奶溶液封闭 60 min
一抗反应时间	血清孵育 37°C，60 min
二抗反应时间	酶标二抗作用 37°C，60 min
底物显色时间	5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min
判定	测定 OD _{450nm} ，选取阴性血清 OD _{450nm} (N) 在 0.5 左右，阳性血清 OD _{450nm} (P) 值在 1 左右，且 P/N 比值最大的一组作为最佳条件

2.2.6.8 判断标准的确定

利用本研究建立并优化后的间接 ELISA 检测方法检测 50 份随机的猪的血清样品，在具有单侧 99%的可信度情况下，用测得的猪阴性血清样品的 OD_{450nm} 均值 + 3SD (SD: 标准偏差) 得到一侧阴性样品的判定值；用测得的猪阳性血清样品 OD_{450nm} 均值 - 3SD 得到另一侧的阳性判定值。阴性血清和阳性血清的临界值 (cut-off value) 确

定后, 由于本实验室保存有一定的数目的猪阳性和阴性血清样品, 因此用测得的猪的阴性血清样品 OD_{450nm} 均值+3SD (SD: 标准偏差) 作为血清样品判定结果的最终临界值。

2.2.7 间接 ELISA 检测方法的应用

2.2.7.1 样品的收集

2020-2021 年山东各地送检及采集的样品主要来自烟台、青岛、潍坊、菏泽、临沂、泰安、济南等 14 个地市不同规模的养猪场, 山东各地送检及采集的样品主要包括不同种群的猪的血清样品, 共收集血清样品 1,170 份。在所有的猪的血清样品中按照猪的不同种群分为 5 种类型: 仔猪 (≤ 75 日龄)、育肥猪 (100 日龄~210 日龄, 体重 40 kg~130 kg)、妊娠母猪 (≥ 180 日龄, 体重 ≥ 150 kg, 处于怀孕或哺乳期)、后备母猪 (120 日龄~160 日龄, 体重 130 kg~160 kg)、种公猪 (≥ 10 月龄, 具有成熟的育种能力和良好的授精能力)。按照养殖场不同规模划分为大型养殖场 (养殖规模 $> 2,000$ 头)、小型养殖场 (养殖规模 $< 1,500$ 头) 和散养场 (养殖规模 < 500 头)。

2.2.7.2 批内重复试验和批间重复试验

使用制备好的同一批 SAG1 重组蛋白进行 ELISA 酶标板的包被, 本实验室保存有猪的阳性血清样品和阴性血清样品, 应用本研究建立的间接 ELISA 检测方法进行阴阳性血清样品的板内和板间的重复性检测。连续三天时间内对同一血清样品进行 ELISA 的检测, 每个样品设置 4 个平行孔, 通过酶标仪读取吸光度数值比较血清样品的 OD_{450nm} 的值。

2.2.7.3 与免疫印迹方法和间接荧光抗体方法的对比试验

间接免疫荧光抗体试验的具体操作步骤如下:

1. 将洁净的盖玻片置于 100%酒精和去离子水中冲洗, 晾干备用。
2. 纯化虫株, PBS 洗涤 2 次后重悬, 吸取适量的速殖子滴于干净的盖玻片上涂抹均匀后, 静置 3 min, 吸弃表面的液体。
3. 固定: 在铺有速殖子的玻片上缓慢滴加 4%多聚甲醛数滴, 室温静置 30 min, 再用用 PBS 溶液进行玻片的清洗, 每次 5 min, 洗 3 次。

4. 透化：用 PBS 配制 0.25% Tritonx-100 溶液，滴于玻片上，室温作用 20 min，PBS 清洗 1 次，每次 5 min。
5. 封闭：用 PBS 配制 3% BSA 溶液，滴于玻片上，室温作用 30 min。
6. 一抗孵育：用抗体稀释液（3% BSA 溶液）将猪的血清稀释（1:150），滴于玻片表面与速殖子孵育，放置 37°C 恒温箱，1 h，孵育结束后，用 PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
7. 二抗孵育：用抗体稀释液将 FITC（绿光）标记的抗猪二抗抗体稀释（1:100）后滴于玻片表面进行孵育，放置 37°C 恒温箱，1 h，孵育结束后，用 PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
8. 封片：在干净的载玻片上滴加适量的荧光淬灭剂，将载玻片倒置于载玻片，避免产生气泡，用封片剂将盖玻片边缘密封，此步骤要避光操作。
9. 每个载玻片上做好对应的标记，放置在切片盒内，避光 4°C 保存。
10. 在荧光显微镜下观察，以猪的阳性、阴性血清样本作为参考指标。判断待检猪血清样本的阴性、阳性，记录数据并拍照保存。

3 结果与分析

3.1 基因的克隆与表达质粒的鉴定

用试剂盒提取弓形虫 RH Δ ku80 株 DNA, 以弓形虫速殖子为 cDNA 模板进行 PCR 扩增, 结果如图所示, 在大约 792 bp 处有一明显清晰的条带, 说明成功扩增得到相应的 *SAG1* 基因。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳进行胶回收, 将胶回收产物与载体进行连接转化, 得到 pGEX-6p-SAG1 的重组质粒。结果如图所示, 在大约 1,092 bp 处有一明显清晰的条带, 结果表明成功构建表达质粒 pGEX-6p-SAG1。

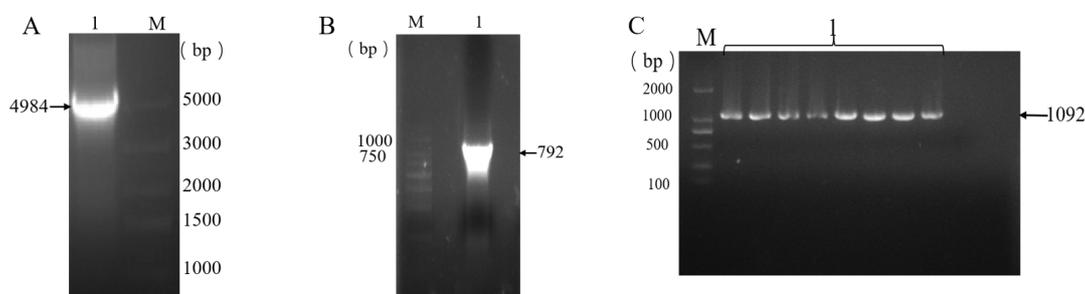


图 1 基因的克隆与表达质粒的鉴定

Fig. 1 Gene cloning and expression plasmid identification

A: pGEX-6p-1 基因扩增产物; M: DL5,000 DNA Marker 1: pGEX-6p-1 基因扩增产物

B: *SAG1* 基因扩增产物; M: DL2,000 DNA Marker 1: *SAG1* 基因扩增产物

C: pGEX-6p-SAG1 质粒鉴定结果; M: DL2,000 DNA Marker 1: pGEX-6p-SAG1 质粒产物

A: Amplification products of pGEX-6p-1 gene;

M: DL5,000 DNA Marker 1: Amplification products of pGEX-6p-1 gene

B: Amplification products of *SAG1* gene;

M: DL2,000 DNA Marker 1: Amplification products of *SAG1* gene

C: Identification of pGEX-6p-SAG1 plasmid by double digestion;

M: DL2000 DNA Marker 1: Double restriction products of pGEX-6p-SAG1 plasmid

3.2 *SAG1* 蛋白的表达与纯化

3.2.1 pGEX-6p-SAG1 质粒的最佳表达条件

通过对比质粒表达的诱导温度 (37°C、22°C、16°C)、时间 (2 h、4 h、8 h、12 h、18 h)、IPTG 浓度 (0.1 mM、0.3 mM、0.5 mM) 经 SDS-PAGE 电泳验证分析, 依据蛋白的表达量, 确定在诱导温度为 22°C、诱导时间为 4 h、IPTG 工作浓度为 0.5

mmol/L 时，蛋白表达量在上清中表达最佳，目的蛋白条带大小约为 54 kDa，与理论大小一致。

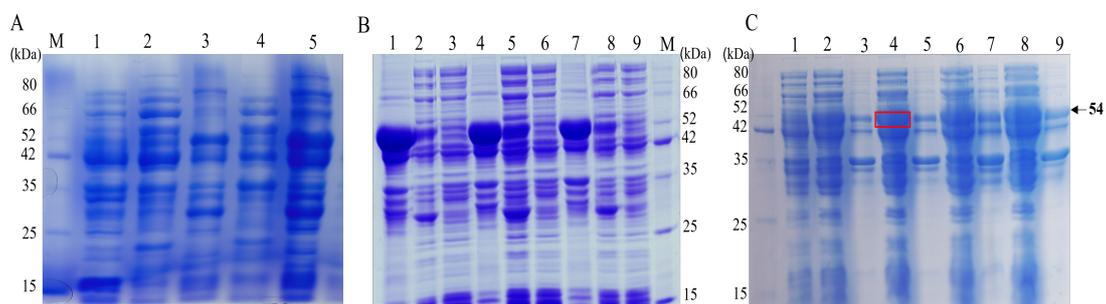


图 2 不同诱导条件对 SAG1 蛋白表达的影响

Fig. 2 Expression of SAG1 protein induced by different induced time

- A: 16°C诱导表达条件；1：未经 IPTG 诱导的质粒菌体；M：蛋白 Marker
2~5：分别在 16°C、IPTG 浓度 0.5 mmol/L、不同诱导时间诱导的质粒菌体
- B: 37°C诱导表达条件；1：未经 IPTG 诱导的质粒菌体；M：蛋白 Marker
2~9：分别在 37°C、IPTG 浓度 0.5 mmol/L、不同诱导时间诱导的质粒菌体
- C: 22°C诱导表达条件；1：未经 IPTG 诱导的质粒菌体；M：蛋白 Marker
2~9：分别在 22°C、IPTG 浓度 0.5 mmol/L、诱导时间 4 h 后的质粒菌体

- A: Induced expression at 16°C; 1: Non-IPTG induced pGEX-6p-SAG1 plasmid bacteria; M: Protein Marker
2~5: Plasmid thalli were induced at 16°C, IPTG concentration 0.5 mmol/L and different induction time.
- B: Induced expression at 37°C; 1: Non-IPTG induced pGEX-6p-SAG1 plasmid bacteria; M: Protein Marker
2~9: Plasmid thalli were induced at 37°C, IPTG concentration 0.5 mmol/L and different induction time.
- C: Induced expression at 22°C; 1: Non-IPTG induced pGEX-6p-SAG1 plasmid bacteria; M: Protein Marker
2~9: Plasmid thallus were cultured at 22°C, IPTG concentration 0.5 mmol/L and induction time 4 h, respectively.

3.2.2 SAG1 蛋白的鉴定

经谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 GST 标签纯化树脂进行蛋白纯化，获得的 SAG1 蛋白，经 SDS-PAGE 电泳分析蛋白的表达情况，由结果图（图 3）可以看出，SAG1 融合 GST 标签表达经 SDS-PAGE 分析为上清表达，发现目的蛋白条带单一，分子量大小约为 54 kDa，分子量与理论大小值基本一致。试剂盒测定蛋白浓度，蛋白浓度为：0.96 mg/mL。

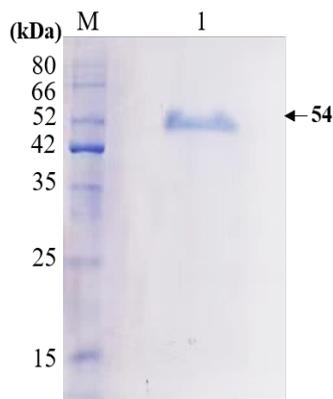


图 3 SDS-PAGE 鉴定 pGEX-6p-SAG1 重组蛋白表达

Fig. 3 The expression of pGEX-6p-SAG1 was identified by SDS-PAGE

M: 蛋白 Marker; 1: pGEX-6p-SAG1 重组蛋白表达

M: Protein Marker; 1: Expression of pGEX-6p-SAG1 recombinant protein

3.2.3 SAG1 蛋白与血清的特异性识别

应用谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 GST 标签纯化树脂纯化最终获得的分子量大小约为 54 kDa 的 SAG1 重组蛋白, 经 Western Blot 鉴定分析, SAG1 原核表达蛋白与弓形虫阳性血清呈现良好的反应, 且阳性血清不与无关蛋白发生反应。

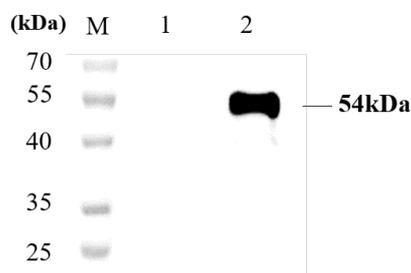


图 4 纯化蛋白与猪弓形虫阳性血清的 Western Blot 鉴定

Fig. 4 Western blot analysis with *T. gondii* positive serum

1: SAG1 蛋白的 WB 鉴定; 2: 无关蛋白的 WB 鉴定; M: 蛋白 Marker

一抗: 阳性血清 1:500 稀释, 二抗: 兔抗猪抗体 1:4,000 稀释

1: Performed with *T. gondii* positive sera inoculated with SAG1

3.3 间接 ELISA 最佳工作条件的确定

3.3.1 最佳抗原包被量及抗原包被液的确定

用 SAG1 蛋白作为抗原进行 ELISA 酶标板的包被，SAG1 抗原包被量由 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 逐渐增为 1.5 $\mu\text{g/mL}$ (0.3 μg 、0.5 μg 、1 μg 、1.5 μg)，通过 P/N 比值最大的一组作为最佳条件，结果显示 SAG1 抗原最佳的包被量是 1 $\mu\text{g/mL}$ 。

选择 PBS 缓冲液 (0.01 M, pH7.4)、碳酸盐缓冲液 (0.05 M, pH 9.6) 作为抗原包被缓冲液, 1 $\mu\text{g/mL}$ 抗原量包被 ELISA 板。每次板内反应均设置阴性阳性对照孔, 每个条件作三孔重复, 按照间接 ELISA 的具体操作步骤进行, 通过 P/N 比值最大的一组作为最佳条件, 确定最佳抗原包被缓冲液为碳酸盐缓冲液 (0.05 M, pH 9.6)。

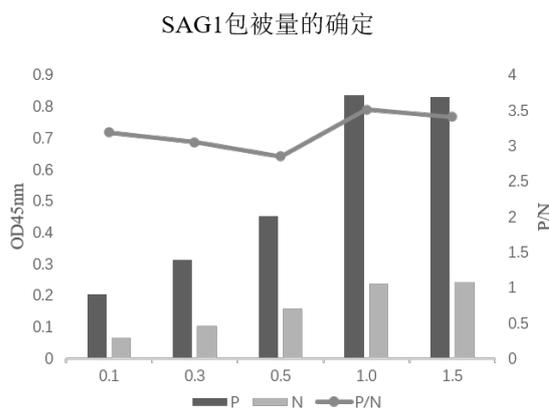


图 5 SAG1 抗原包被量的确定

Fig. 5 Determination of the coating concentration of recombinant protein SAG1

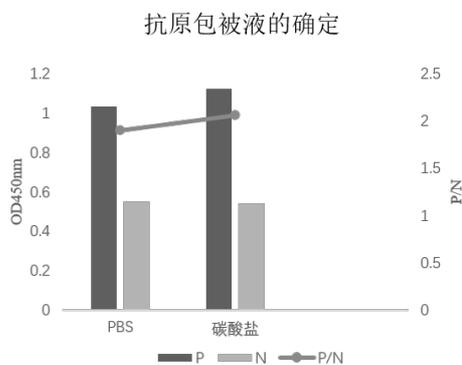


图 6 抗原包被液的确定

Fig. 6 Determination of the coating condition of recombinant protein

3.3.2 最佳抗体稀释液的确定

以最佳抗原量包被 ELISA 板, 分别以 PBS (0.01 M, pH 7.4)、3%脱脂奶溶液作为备选的抗体稀释液, 每次板内反应均设置阴性阳性对照孔, 每个条件作三孔重复, 按

照间接 ELISA 的具体操作步骤进行, 通过 P/N 比值最大的一组作为最佳条件, 确定最佳抗体稀释液为 3% 脱脂奶溶液。

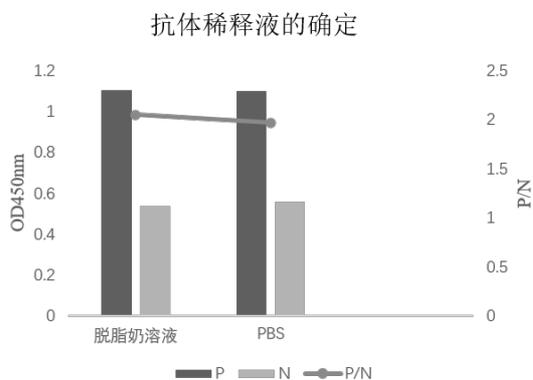


图 7 抗体稀释液的确定

Fig. 7 Determination of serum and HRP-labeled rabbit-anti-pig IgG dilution of recombinant protein

3.3.3 最佳封闭时间的确定

以最佳抗原包被量包被 ELISA 板, 选择 3% 脱脂奶溶液作为封闭液, 每板内反应均设置阴性阳性对照孔, 每个条件作三孔重复, 按照间接 ELISA 的具体操作步骤进行, 分别封闭 30 min、60 min、90 min、120 min, 通过 P/N 比值最大的一组作为最佳条件, 确定最佳封闭时间为 60 min。

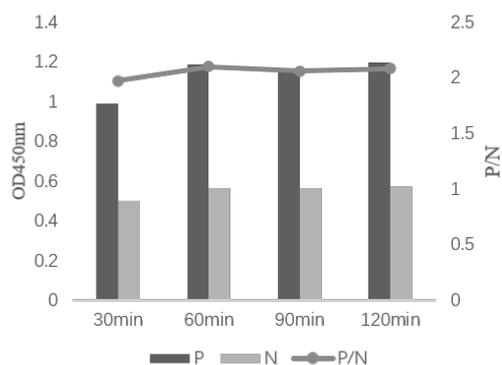


图 8 封闭时间的确定

Fig. 8 Determination of reactive time of blocking

3.3.4 一抗及酶标二抗孵育时间的确定

以最佳抗原包被量包被 ELISA 板, 3% 脱脂奶溶液 37°C 封闭 1 h, 3% 脱脂奶溶液稀释一抗、二抗, 一抗血清稀释度为 1:100, 二抗稀释度为 1:4,000, 一抗血清孵育时

间分别设为 30 min、60 min、90 min，二抗孵育时间分别设为 30 min、45 min、60 min、90 min，每次板内反应均设置阴性阳性对照孔，每个条件作三孔重复，按照间接 ELISA 的具体操作步骤进行，通过 P/N 比值最大的一组作为最佳条件，确定一抗血清最佳孵育时间为 37°C，60 min，二抗最佳孵育时间为 37°C，60 min。

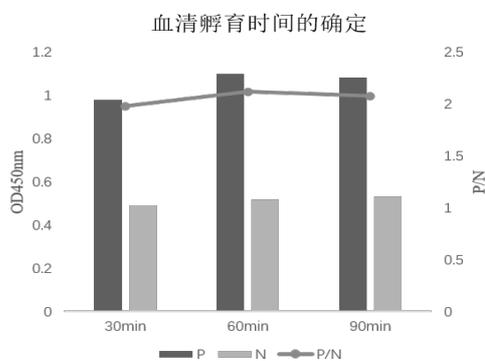


图 9 一抗孵育时间的确定

Fig. 9 Determination of incubating time of serum

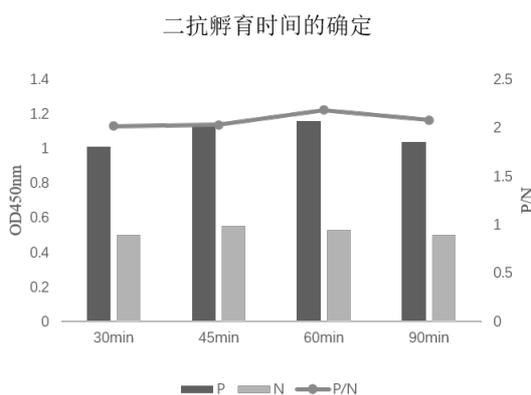


图 10 二抗孵育时间的确定

Fig. 10 Determination of incubating time of HRP-labeled rabbit-anti-pig IgG

3.3.5 底物最佳反应时间的确定

以最佳 SAG1 抗原包被量包被 ELISA 板，3% 脱脂奶溶液 37°C 封闭 1 h，一抗血清、二抗抗体孵育 37°C，60 min，底物反应时间分别设为 5 min、10 min、15 min、15 min、20 min、25 min、30 min，每次板内反应均设置阴性阳性对照孔，每个条件作三孔重复，按照间接 ELISA 的具体操作步骤进行，通过 P/N 比值最大的一组作为最佳条件，确定 TMB 显色底物最佳反应时间为 20min。

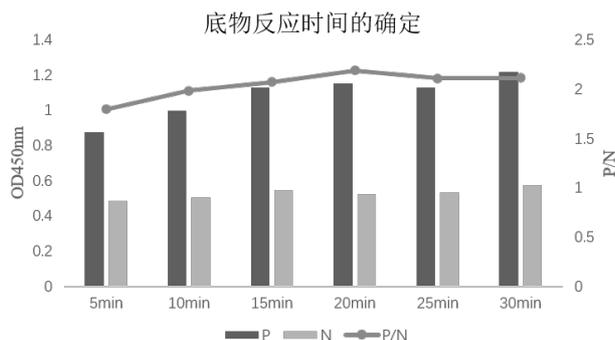


图 11 底物反应时间的确定

Fig. 11 Condition of substrate of recombinant protein

3.3.6 判定标准的确定

本实验室保存有一定数量的猪阴性血清样本，即临界值 cut off value = 阴性血清样本 OD450 均值+3SD（标准偏差）。应用本研究建立的间接 ELISA 方法测得的猪弓形虫阴性血清的 OD450 均值为 0.528，SD = 0.0108，cut off value = OD450 均值+3SD = 0.56。

3.3.7 批内重复试验和批间重复试验

用本实验室保存的猪弓形虫阳性血清和阴性血清各一份，连续三天使用相同的检测步骤做板内重复性试验和板间重复性试验，具体数据见下表。统计学分析表明，间接 ELISA 方法板内和板间血清重复性差异不显著，证明所建立的间接 ELISA 检测方法具有良好的可重复性。

表 14 间接 ELISA 稳定重复试验结果（相同批次蛋白）

Table 14 Result of repeatability test for indirect ELISA

样品	时间	板内重复				平均值	板间重复				平均值
Serum	Time	Intra-plate duplicates				Mean	Inter-plate duplicates				Mean
阳性血清 (OD450nm)	Day1	1.126	1.129	1.130	1.127	1.128	1.119	1.126	1.129	1.126	1.125
	Day2	1.122	1.127	1.126	1.128	1.126	1.126	1.128	1.122	1.125	1.125
	Day3	1.126	1.124	1.141	1.129	1.130	1.130	1.119	1.130	1.127	1.127
阴性血清 (OD450nm)	Day1	0.519	0.523	0.514	0.527	0.520	0.556	0.497	0.510	0.524	0.522
	Day2	0.499	0.530	0.534	0.521	0.521	0.512	0.516	0.601	0.521	0.538
	Day3	0.539	0.504	0.517	0.529	0.522	0.530	0.545	0.539	0.518	0.533

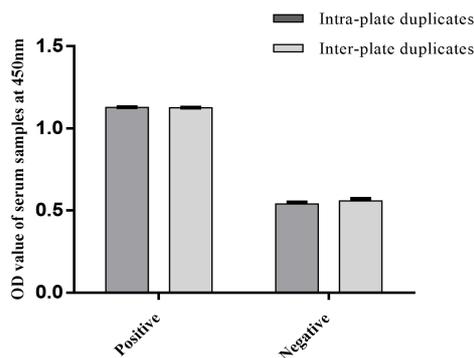


图 12 间接 ELISA 重复性试验结果，差异不显著。

Fig. 12 Repeatability test results of indirect ELISA.

ns, $P > 0.05$ Indicates not significant; $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$.

3.3.8 与免疫印迹方法和间接荧光抗体方法的对比试验

用免疫印迹与间接荧光抗体检测方法对 50 份猪的血清样品进行检测，同时用建立的间接 ELISA 检测方法检测 50 份猪的血清样品，比较样品的符合率和特异性。数据见下表，结果表明，重组蛋白建立的间接 ELISA 检测方法与其他两种方法相比总体符合率较高（98%），可以用于猪的血清样品中弓形虫抗体的检测。

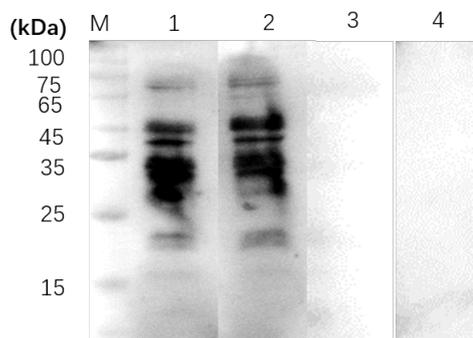


图 13 利用弓形虫的全蛋白 RHΔKu80 进行 Western blot 验证

Fig. 13 ELISA results were confirmed by Western-blotting.

M: 蛋白 Marker, 1: 阳性样本, 2: 阳性对照, 3: 阴性对照, 4: 阴性样本

一抗: 血清样品 1:500 稀释, 二抗: 兔抗猪抗体 1:4,000 稀释

M: marker, 1: Positive samples, 2: Positive control, 3: Negative control, 4: Negative samples.

表 15 ELISA 与 IFAT、WB 比较试验

Table 15 Result of ELISA was compared with IFAT and WB

IFAT/ WB 结果	ELISA 结果
Result of IFAT/ WB	Result of ELISA

阳性 (Positive)	8	7
阴性 (Negative)	42	43
总数 (Total)	50	50
阳性率 (Positive rate)	16%	14%

3.4 间接 ELISA 检测方法的初步应用

3.4.1 山东部分地区猪弓形虫病抗体检测结果

本次试验共收集山东省泰安、青岛、潍坊、烟台、聊城、济南等 14 个地区的猪的血清样品共 1,170 份。利用建立的间接 ELISA 检测方法对山东省不同地区的猪的血清样品进行检测，检测结果表明所有样本的平均阳性率约为 20.85%，山东省不同地区的阳性感染率各有差异，总体流行率较高，其中流行率最高的地区泰安可高达约 22.98%。

表 16 山东省不同地区猪弓形虫病抗体检测结果

Table 16 Serological test results of toxoplasmosis in different areas.

样品来源	样品数	阳性样品数	阳性率
泰安	322	74	22.98%
青岛	172	35	20.34%
潍坊	140	29	20.71%
烟台	101	20	19.80%
聊城	86	17	19.77%
临沂	62	14	22.58%
菏泽	53	11	20.75%
济宁	45	10	22.22%
枣庄	34	7	20.58%
济南	32	5	15.63%
淄博	32	6	18.75%
德州	31	6	19.35%
日照	30	5	16.67%
威海	30	5	16.67%
样品总数	1,170	244	20.85%



图 14 山东部分地区阳性血清样本的地理分布

Fig. 14 Geographic distribution of positive samples.

地图颜色由浅到深，表明猪弓形虫病的发病率不同。ND: 没有数据

The color from light to dark indicates the different prevalence rates of *T. gondii*. ND: no data

3.4.2 不同种群中猪弓形虫病的检测结果

对山东省收集的所有样品按照猪的不同种群进行分类，主要分为仔猪、育肥猪、种公猪、后备母猪、妊娠母猪，利用 ELISA 检测方法检测，结果显示：猪弓形虫病血清抗体阳性率感染率最高的是妊娠母猪（25.7%），其次是种公猪（22.7%）、后备母猪（21.1%）、育肥猪（18.3%）和仔猪（17.1%），对比其他猪，仔猪的弓形虫抗体阳性率最低。

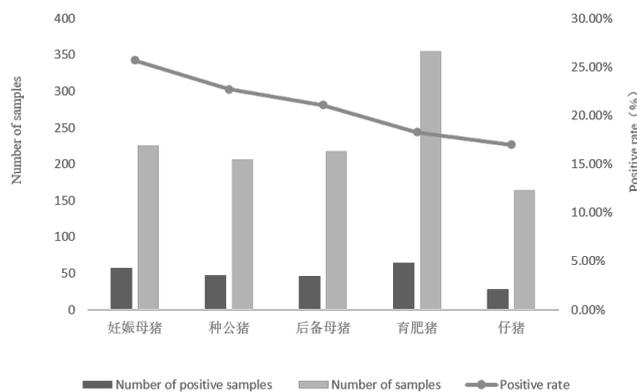


图 15 不同种群中猪弓形虫病的抗体检测结果

Fig. 15 Seroprevalence of *T. gondii* in different populations.

3.4.3 不同规模养殖场中猪弓形虫病的检测结果

对山东省收集的所有样品按照猪场的不同规模进行分类，利用建立的 ELISA 检测方法检测，检测结果显示，在所有样本中，425 份猪的血清样品来自大型养殖场（>2,000 头），大型养殖场弓形虫病阳性感染率最低，约为 15.2%；435 份

猪的血清样品来自小型农场 (<1,500 头)，其中小型养殖场猪的弓形虫病抗体阳性率约为 22.7%；310 份来自散养场的猪的血清样品 (<300 头)，散养场弓形虫病的阳性率最高约为 25.8%。

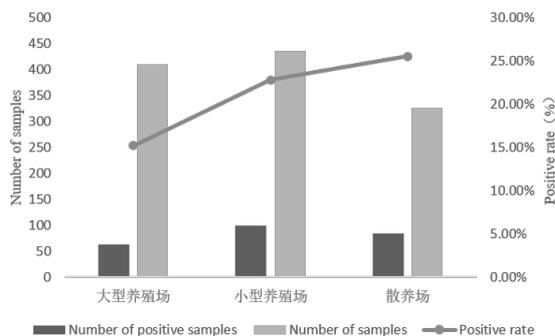


图 16 不同规模养殖场的猪弓形虫病抗体检测结果

Fig. 16 Prevalence situation of *T. gondii* in different farm scales.

4 讨论

弓形虫是世界范围内存在的重要人畜共患疾病之一，弓形虫感染在全球人类和动物中都很常见。生猪产业对许多国家的经济都非常重要，尤其是美国、中国和欧洲等国家 (Foroutan *et al.*, 2019)。目前，大量资料调查显示，在全世界范围内弓形虫病广泛存在于包括猪在内的多种动物的养殖场内，一直以来，猪弓形虫感染是公众健康关注的重要问题 (Pipia *et al.*, 2018)。猪在感染弓形虫后严重可造成猪的死亡，怀孕母猪感染弓形虫后可造成流产、产死胎，大部分隐性感染由于临床症状不明显，病猪没有及时被发觉并未淘汰，容易造成弓形虫在猪群中广泛传播。

在全球范围内，随着世界人口的增加，猪肉一直是肉类蛋白质的重要来源。据估计，到 2027 年，全球猪肉消费量将增长到 1.3 亿吨左右 (Foroutan *et al.*, 2019)。因此，主要是猪肉，尤其是未煮熟的、生的或腌制的猪肉产品，可能是包括弓形虫在内的肉源性病原体传播的主要因素 (Belluco *et al.*, 2018)。在中国，随着经济的不断发展，人们生活水平的提高，养殖业发展迅速，猪的养殖数量逐渐增加。根据国家统计局对山东省养猪规模的调查统计，直至 2021 年第一季度，山东生猪存栏量 2,822 万头，繁育母猪 303 万头。在中国，猪肉是人们主要的肉类来源。据估计，中国猪肉、鸡肉、羊肉和牛肉的年产量分别为 55 万吨、18 万吨、400 万吨和 700 万吨 (中国国家统计局, 2015 年更新)。在过去几十年中，肉类已成为主要和受欢迎的食物 (Yang *et al.*, 2017)。炖肉、米饭、面条和大量煮熟的蔬菜是中国传统饮食的主要成分。生肉或未煮熟的肉在大多数中国人的日常饮食中并不常见，然而，火锅、烧烤和生牛奶等未煮熟的动物产品在某些地区很受欢迎 (Dong *et al.*, 2018)。在美国和中国等国家，在许多食用动物中，猪被认为是传播弓形虫最重要的动物，因为很少有从牛或室内饲养的鸡身上分离到活的弓形虫，据血清流行病学数据表明，在美国，摄入含有弓形虫的不适当烹调肉类是人们主要感染源 (Dubey Jones, 2008)。猪是人类感染弓形虫病最重要的潜在来源，更重要的是，世界各地已经记录了几项与食用受感染猪肉有关的人类弓形虫病研究 (Vitale *et al.*, 2014)。弓形虫在猪群中的广泛流行早已引起了世界各国科学家们的关注，在 50 多个国家进行的血清学调查显示，在墨西哥、西班牙和埃塞俄比亚等国家，接触弓形虫的猪的平均患病阳性率高达 30% (Dubey *et al.*, 2020; Foroutan *et al.*, 2019; Rostami *et al.*, 2017)。弓形虫在食用生产动物中的感染已成为

全世界的一个重要的公共卫生问题。尽管肉类的安全性一直受到严格监控，但人们仍然担心可能通过食用生的或未煮熟的含有弓形虫卵囊的肉类传播寄生虫这一潜在风险。因此加强人畜共患病源头防控，阻断动物疫病传播途径，对维护畜牧业生产安全、公共卫生安全和生物安全具有重要意义。

目前全世界猪感染弓形虫病在养殖场越来越常见，猪弓形虫检测方法具有明确的重要性及迫切性 (Wang *et al.*, 2017)。由于弓形虫较为复杂的生活史导致家畜弓形虫病的诊断具有一定的挑战性 (HurtTammaro, 2007)。目前，国内外很多专家已经运用各种各样的抗原设计了大量的血清学试验，但从文献来看，基于 SAG1 和 GRA7 的间接酶联免疫吸附试验似乎是最可靠的，其敏感性和特异性分别接近 100%和 96%以上。然而，已发表的评估 ELISA 的敏感性、特异性的研究表明，除少数试剂盒以外，大多数国产试剂盒的质量不足以用于临床检测，还是存在很多的不足。因此，仍然需要努力将一些实验室检测转化为可靠的并且在商业上可获得的用于诊断猪弓形虫病的产品 (Castillo-Cuenca *et al.*, 2020)。间接免疫荧光法 (IFA)、改良凝集试验 (MAT) 和酶联免疫吸附试验 (ELISA) 是猪的弓形虫抗体检测的主要试验方法 (Garcia *et al.*, 2005)。间接免疫荧光法 (IFA) 和改良凝集试验 (MAT) 可检测动物早期感染时出现的抗体 (Garcia *et al.*, 2008)，酶联免疫吸附试验 (ELISA) 能够在动物感染后检测到弓形虫的抗体 (Garcia *et al.*, 2017)。然而，使用几种血清学试验进行的比较研究发现，间接 ELISA 是猪 IgG 检测中最敏感的方法 (Hill *et al.*, 2010)。许多研究表明，SAG1 是弓形虫病诊断和疫苗开发的重要候选抗原之一，但应用于临床检测的标准试剂盒极少，稳定性及准确性存在很大差异。据相关文献表明 SAG1 在表达后显示出特异性免疫活性，并且它不需要进一步的重折叠过程 (Castillo-Cuenca *et al.*, 2020)。在本研究中，截短的 SAG1 表达为融合蛋白的可溶性形式，通常适合正确折叠，并且我们发现基于 SAG1 的 ELISA 试剂盒可用于灵敏和特异地检测弓形虫感染。因此，本研究中构建的载体和优化的表达条件在生产作为诊断抗原的 SAG1 时在数量和质量上都非常有用。

根据地理区域、社会和文化条件、气候和环境变量，不同国家之间和国家内部的人类弓形虫病存在差异，地理纬度和年平均温度是弓形虫传播的两个重要决定因素 (Foroutan-Rad *et al.*, 2016)。有人认为，与炎热干燥的气候相比，温暖潮湿的气候更有可能导致弓形虫感染的高发病率 (Dubey, 1998; Herrero *et al.*, 2016)。这是因为干燥

的气候对弓形虫卵囊的存活和传播具有不利影响，温暖的气候可能会降低卵囊存活的机会，通常会降低弓形虫病的流行率。据相关文献统计，随着地理纬度的增加，弓形虫感染的血清流行率也会有所增加，需要注意的是，这些数据仅针对报告血清流行率检测数据的部分地区，因为许多热带和亚热带地区的信息资料很少。弓形虫在不同宿主中的血清流行率在不同的地理纬度上有所不同，主要可能与孢子形成和卵囊存活所需的气候条件有关，弓形虫卵在土壤中的最适温度为 20°C~30°C (Yan *et al.*, 2016; Lindsay *et al.*, 2003)。事实上，在湿度更高、气候更温暖的地区，弓形虫的发病率更高 (Dubey *et al.*, 2012)。此外，弓形虫卵囊的积累通常发生在春季、夏季和初秋，此时的温度适合孢子形成过程 (Yan *et al.*, 2016; Lindsay *et al.*, 2003)。降水量的增加导致春季、夏季和秋季气候温暖湿润，这可能有利于弓形虫卵囊的存活 (Ibrahim *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2014)。弓形虫在肉类和肉制品中的传播通常也取决于文化习俗和卫生习惯，并因不同地区而异 (Guo *et al.*, 2015)。本研究中，山东部分地区猪感染弓形虫的平均阳性率约为 20.85%，明显低于河北省（属于华北地区）猪的血清流行率 37%，重庆市（属于西南地区）猪的血清流行率 68%，湖南省（属于华中地区）猪的血清流行率 29%，不同地理区域血清流行率的差异可能是由多种原因造成的，其中包括气候、动物生产系统和具体的防控措施等 (Zhang *et al.*, 2019)。根据山东省气候中心的统计，泰安市 2020-2021 年的降水量相对较高，这与泰安市的高发病率相一致。此外，大型养殖场中受控的温度和湿度条件减少了弓形虫卵囊的传播，这是大型养殖场中猪弓形虫病流行率低的一个主要因素。

在人类和许多动物宿主中，猪弓形虫病的流行率可能会随着年龄的增长而增加 (Jittapalpong *et al.*, 2005; Rostami *et al.*, 2017)。年龄是影响猪血清流行率的一个重要因素，因为大多数猪在出生后获得弓形虫感染。此外，因为年长的猪有足够长的时间暴露于环境卵囊、啮齿类动物或其他含有组织包囊的动物的尸体中 (Foroutan-Rad *et al.*, 2016; Rostami *et al.*, 2017)。考虑到感染动物体内抗弓形虫 IgG 抗体可能终身存在，较为年长的宿主血清阳性的可能性也更大 (Wang *et al.*, 2021)。猪可分为几个生长阶段，包括仔猪阶段、育肥阶段和母猪或种猪阶段。在本研究中我们的结果表明与之前的研究相同，母猪弓形虫病阳性率高于猪的其他生长阶段。在 1983-1984 年进行的一项基于弓形虫病统计数据有效的全国性调查中，可出售市场的育肥猪弓形虫病的流行率为 23%，母猪弓形虫病的流行率为 42%，与育肥猪相比，母猪的阳性率更高，这

在流行病学上与弓形虫的传播有关 (Dubey *et al.*, 2020)。此前的研究表明, 弓形虫感染家畜影响母畜的繁殖生产畜牧业带来了严重的经济损失 (Boughattas *et al.*, 2011)。在家畜中, 弓形虫引起母猪的流产以及猪群的高死亡率被广泛关注, 弓形虫感染导致的死亡率在仔猪中比在育肥猪中更常见 (Messier *et al.*, 2009)。韩国的一项研究表明, 母猪高达 44% 的流产率以及高达 19% 的母猪死亡率主要与猪感染弓形虫病有关 (Kim *et al.*, 2009)。事实上, 一些研究比较了不同国家育肥猪和母猪弓形虫病的流行率, 母猪弓形虫病的流行率始终高于育肥猪 (Dubey *et al.*, 2020)。我们之前的研究表明, 雌二醇可以促进弓形虫的入侵和增殖, 从而显著促进弓形虫在小鼠中的致病性, 因此我们推测母猪雌激素水平的波动可能是导致弓形虫高传染性的重要因素之一 (Zhang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018)。

此前的研究表明, 饲养环境、养殖密度以及场内外的猫是弓形虫感染的潜在风险因素。猫是弓形虫的最终宿主, 受感染的猫在三周的感染周期内可排出 2,000 多万个卵囊, 养殖场中猫的存在与猪中弓形虫病的阳性率较高显著相关。感染通常发生在从受感染动物的组织中摄取弓形虫包囊、暴露于猫粪便中排出的卵囊、不清洁的生育能力以及卵囊的媒介传播之后 (Campero *et al.*, 2020; Castillo-Cuenca *et al.*, 2020)。猪的弓形虫感染率也与养殖场的管理系统有所差异, 在管理不善或者散养的养殖场内弓形虫感染率更高 (De Berardinis *et al.*, 2017; Bacci *et al.*, 2015)。在山东省, 大型养猪场的生物安全和卫生标准高于小型养猪场, 从而最大限度地防止了上述传播形式的发生。几项研究表明, 良好管理措施的实施, 如有效的啮齿类动物控制计划、防止接触猫、生产设施的良好卫生、饲料的良好制造和储存做法以及清洁和无污染的水源, 可显著降低弓形虫感染率 (Li *et al.*, 2019; Lindsay *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2017; Pipia *et al.*, 2018; Rostami *et al.*, 2017; Raue *et al.*, 2017)。目前, 山东省大部分大型养殖场养殖技术成熟, 环境优越, 圈养卫生标准高, 养殖密度低, 动物福利好, 饲料加工和饲养科技化, 动物健康问题保护力度加大, 保持了较低的感染率 (15.2%), 并且显著低于小型规模养殖场 (22.8%) 和散养场 (25.5%)。

综上所述, 本研究建立的间接 ELISA 方法具有在临床快速对大量样本进行弓形虫感染筛查的能力, 将该方法应用于农场或屠宰场, 在将动物用于食品生产之前对弓形虫感染进行筛查, 能有效防止食源性感染弓形虫, 对弓形虫从养殖场内进行源头防控, 降低人类感染弓形虫和弓形虫大规模爆发的可能, 防止猪弓形虫病在规模化猪场

内的传播，降低猪弓形虫病的发病率，为进一步研究及制定科学的防治对策提供依据。由于弓形虫感染无宿主特异性，本检测方法未来可进一步完善用于宠物和人类的血清学检测以及标准化试剂盒的研发。此外，大部分猪主要通过摄入污染的环境中的弓形虫卵囊而感染，因此监测分析山东省猪群弓形虫感染率，加强人畜共患病源头防控，阻断动物疫病传播途径，对维护畜牧业生产安全、公共卫生安全和生物安全具有重要意义。本研究中由于样本信息有限，不能更进一步深入分析，在山东大范围的猪场采集的猪血清样本相对较少，同时样本的采集信息收集不够详细，例如缺少猪的品种，猪场周边情况等具体信息，因此难以进行更为精确的分析，这是本次研究中较为明显的不足之处。这也提醒我们在未来进行流行病学调查过程中，应尽量详实地纪录样本的相关资料，以利于检测结果的全面分析。

5 结 论

1、利用弓形虫的截短表面抗原 1 (SAG1) 蛋白建立了一种快速敏感的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 来诊断猪弓形虫病。

2、猪弓形虫病在山东省猪场内流行, 不同地区的发病率约在 15.63%到 22.98%之间, 经调查其高发病率可能与养殖场饲养条件、生产环境等因素有关。

参考文献

- 刘英. 弓形虫病的感染特点及其防治措施. 畜牧兽医杂志, 2015, 34(01):83-84.
- 刘明远, 刘全, 方维焕, 尹继刚, 王学林, 李建华, 姜宁, 张西臣, 白雪, 吴秀萍. 我国的食源性寄生虫病及其相关研究进展. 中国兽医报, 2014,34(07):12051224.
- 任庆娥, 周春香, 菅复春, 冯超, 张龙现. 弓形虫病分子诊断技术研究进展. 中国畜牧兽医, 2009,36(05):66-71.
- 王立新. 猪弓形虫病的流行病学、临床症状、检疫及防治措施. 现代畜牧科技, 2020(10):141-142.
- 刘靖清, 张亮, 袁涛. 猪弓形虫病血清流行病学调查与分析. 兽医导刊, 2010(04):25-26+42.
- 张居作, 陈汉忠, 徐君飞. 我国弓形虫的感染现状. 动物医学进展, 2008(07):101-104.
- 杨阳. 猪弓形虫病的临床表现、诊断和防治措施. 现代畜牧科技, 2022(01):81-82.
- Alvarado-Esquivel C., Carrillo-Oropeza D., Pacheco-Vega S. J., Hernandez-Tinoco J., Salcedo-Jaquez M., Sanchez-Anguiano L. F., Ortiz-Jurado M. N., Alarcon-Alvarado Y., Liesenfeld O. and Beristain-Garcia I. *Toxoplasma gondii* exposure in patients suffering from mental and behavioral disorders due to psychoactive substance use. *BMC Infect Dis*, 2015,(15):172.
- Alvarado-Esquivel C., Mercado-Suarez M. F., Rodriguez-Briones A., Fallad-Torres L., Ayala-Ayala J. O., Nevarez-Piedra L. J., Duran-Morales E., Estrada-Martinez S., Liesenfeld O., Marquez-Conde J. A. and Martinez-Garcia S. A.. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in healthy blood donors of Durango, Mexico. *BMC Infect Dis*, 2007,(7):75.
- Alzaheb R. A. and Al-Amer O.. The Seroprevalence and Risk Factors of *Toxoplasmosis* Among Female Undergraduate University Students in Saudi Arabia. *Oman Med J*, 2017,(32):486-491.
- Baba M., Batanova T., Kitoh K. and Takashima Y.. Adhesion of *Toxoplasma gondii* tachyzoite-infected vehicle leukocytes to capillary endothelial cells triggers timely parasite egression. *Sci Rep*, 2017,(7):5675.
- Bacci C., Vismarra A., Mangia C., Bonardi S., Bruini I., Genchi M., Kramer L. and Brindani

- F.. Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range, organic pigs in Italy using serological and molecular methods. *Int J Food Microbiol*, 2015,(202):54-56.
- Bamba S., Halos L., Tarnagda Z., Alanio A., Macé P., Moukoury S., Sangaré I., Guiguemdé R., Costa J.-M. and Bretagne S.. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and direct genotyping using minisequencing in free-range pigs in Burkina Faso. *International Journal of Food Microbiology*, 2016,(230):10-15.
- Beghetto E., Spadoni A., Bruno L., Buffolano W. and Gargano N.. Chimeric antigens of *Toxoplasma gondii*: toward standardization of toxoplasmosis serodiagnosis using recombinant products. *J Clin Microbiol*, 2006,(44):2133-2140.
- Belluco S., Simonato G., Mancin M., Pietrobelli M. and Ricci A.. *Toxoplasma gondii* infection and food consumption: A systematic review and meta-analysis of case-controlled studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018,(58):3085-3096.
- Bokken G. C., Bergwerff A. A. and van Knapen F.. A novel bead-based assay to detect specific antibody responses against *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spiralis* simultaneously in sera of experimentally infected swine. *BMC veterinary research*, 2012,(8):36.
- Boughattas S., Bergaoui R., Essid R., Aoun K. and Bouratbine A.. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among horses in Tunisia. *Parasites & vectors*, 2011,(4):218.
- Cademartori B. G., Santos L. M., Oliveira F. C., Quevedo P., Oliveira P. A., Ramos T. S., Rocha A. S., Ruas J. L. and Farias N. A.. Isolation and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in naturally infected (rustic farm) pigs in southern Brazil. *Vet Parasitol*, 2014,(203):207-211.
- Calero-Bernal R., Perez-Martin J. E., Reina D., Serrano F. J., Frontera E., Fuentes I. and Dubey J. P.. Detection of Zoonotic Protozoa *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis suihominis* in Wild Boars from Spain. *Zoonoses Public Health*, 2016,(63):346-350.
- Campero L. M., Schott F., Gottstein B., Deplazes P., Sidler X. and Basso W.. Detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in oral fluid from pigs. *Int J Parasitol*, 2020,(50):349-355.
- Castillo-Cuenca J. C., Diaz-Cao J. M., Martinez-Moreno A., Cano-Terriza D., Jimenez-Ruiz S., Almeria S. and Garcia-Bocanegra I.. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in

- extensively raised Iberian pigs in Spain. *Prev Vet Med*, 2020,(175):104854.
- Cleary M. D., Singh U., Blader I. J., Brewer J. L. and Boothroyd J. C.. *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. *Eukaryot Cell*, 2002,(1):329-340.
- Conrath J., Mouly-Bandini A., Collart F. and Ridings B.. *Toxoplasma gondii* retinochoroiditis after cardiac transplantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2003,(241):334-338.
- De Berardinis A., Paludi D., Pennisi L. and Vergara A.. *Toxoplasma gondii*, a Foodborne Pathogen in the Swine Production Chain from a European Perspective. *Foodborne Pathog Dis*, 2017,(14):637-648.
- Deng H., Devleeschauwer B., Liu M., Li J., Wu Y., van der Giessen J. W. B. and Opsteegh M.. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women and livestock in the mainland of China: a systematic review and hierarchical meta-analysis. *Sci Rep*, 2018,(8):6218.
- Dong H., Su R., Lu Y., Wang M., Liu J., Jian F. and Yang Y.. Prevalence, Risk Factors, and Genotypes of *Toxoplasma gondii* in Food Animals and Humans (2000-2017) From China. *Front Microbiol*, 2018,(9):2108.
- Dubey J. P.. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *The Journal of parasitology*, 1998,(84):862-865.
- Dubey J. P.. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol*, 2008,(55):467-475.
- Dubey J. P.. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, 2009,(39):877-882.
- Dubey J. P.. *Toxoplasmosis* in pigs--the last 20 years. *Vet Parasitol*, 2009,(164):89-103.
- Dubey J. P., Cerqueira-Cezar C. K., Murata F. H. A., Kwok O. C. H., Hill D., Yang Y. and Su C., All about *Toxoplasma gondii* infections in pigs: 2009-2020. *Vet Parasitol*, 2020,(288):109185.
- Dubey J. P. and Jones J. L.. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol*, 2008,(38):1257-1278.
- Dubey J. P., Lago E. G., Gennari S. M., Su C. and Jones J. L.. *Toxoplasmosis* in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology.

- Parasitology*, 2012,(139):1375-1424.
- Fallahi S., Rostami A., Birjandi M., Zebardast N., Kheirandish F. and Spotin A.. Parkinson's disease and *Toxoplasma gondii* infection: Sero-molecular assess the possible link among patients. *Acta Trop*, 2017,(173):97-101.
- Feitosa T. F., Ribeiro Vilela V. L., de Almeida-Neto J. L., Dos Santos A., de Moraes D. F., Alves B. F., Nakashima F., Gennari S. M., Rodrigues Athayde A. C. and Pena H. F. J.. High genetic diversity in *Toxoplasma gondii* isolates from pigs at slaughterhouses in Paraiba state, northeastern Brazil: Circulation of new genotypes and Brazilian clonal lineages. *Vet Parasitol*, 2017,(244):76-80.
- Flegre J., Prandota J., Sovickova M. and Israili Z. H.. *Toxoplasmosis*--a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS One*, 2014,(9):e90203.
- Foroutan-Rad M., Majidiani H., Dalvand S., Daryani A., Kooti W., Saki J., Hedayati-Rad F. and Ahmadpour E.. *Toxoplasmosis* in Blood Donors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Transfusion medicine reviews*, 2016,(30):116-122.
- Foroutan M., Fakhri Y., Riahi S. M., Ebrahimpour S., Namroodi S., Taghipour A., Spotin A., Gamble H. R. and Rostami A.. The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs: A systematic review and meta-analysis. *Vet Parasitol*, 2019,(269):42-52.
- Garcia J. L., Burrells A., Bartley P. M., Bartley K., Innes E. A. and Katzer F.. The use of ELISA, nPCR and qPCR for diagnosis of ocular *toxoplasmosis* in experimentally infected pigs. *Res Vet Sci*, 2017,(115):490-495.
- Garcia J. L., Gennari S. M., Navarro I. T., Machado R. Z., Headley S. A., Vidotto O., da Silva Guimaraes Junior J., Bugni F. M. and Igarashi M.. Evaluation of IFA, MAT, ELISAs and immunoblotting for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in paired serum and aqueous humour samples from experimentally infected pigs. *Res Vet Sci*, 2008,(84):237-242.
- Garcia J. L., Gennari S. M., Navarro I. T., Machado R. Z., Sinhorini I. L., Freire R. L., Marana E. R., Tsutsui V., Contente A. P. and Begale L. P.. Partial protection against tissue cysts formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol*, 2005,(129):209-217.

- Gebremedhin E. Z., Kebeta M. M., Asaye M., Ashenafi H., Di Marco V. and Vitale M.. First report on seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in pigs in Central Ethiopia. *BMC veterinary research*, 2015,(11):59.
- Gisbert Algaba I., Verhaegen B., Jennes M., Rahman M., Coucke W., Cox E., Dorny P., Dierick K. and De Craeye S.. Pork as a source of transmission of *Toxoplasma gondii* to humans: a parasite burden study in pig tissues after infection with different strains of *Toxoplasma gondii* as a function of time and different parasite stages. *Int J Parasitol*, 2018,(48):555-560.
- Gruenberg J. and van der Goot F. G.. *Toxoplasma*: guess who's coming to dinner. *Cell*, 2006,(125):226-228.
- Guo M., Dubey J. P., Hill D., Buchanan R. L., Gamble H. R., Jones J. L. and Pradhan A. K.. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in meat animals and meat products destined for human consumption. *J Food Prot*, 2015,(78):457-476.
- Guo M., Mishra A., Buchanan R. L., Dubey J. P., Hill D. E., Gamble H. R., Jones J. L. and Pradhan A. K.. A Systematic Meta-Analysis of *Toxoplasma gondii* Prevalence in Food Animals in the United States. *Foodborne Pathog Dis*, 2016,(13):109-118.
- Hamilton C. M., Kelly P. J., Bartley P. M., Burrells A., Porco A., Metzler D., Crouch K., Ketzis J. K., Innes E. A. and Katzer F.. *Toxoplasma gondii* in livestock in St. Kitts and Nevis, West Indies. *Parasites & vectors*, 2015,(8):166.
- Herrero L., Gracia M. J., Pérez-Arquillué C., Lázaro R., Herrera M., Herrera A. and Bayarri S.. *Toxoplasma gondii*: Pig seroprevalence, associated risk factors and viability in fresh pork meat. *Vet Parasitol*, 2016,(224):52-59.
- Hill D. E., Dubey J. P., Baroch J. A., Swafford S. R., Fournet V. F., Hawkins-Cooper D., Pyburn D. G., Schmit B. S., Gamble H. R., Pedersen K., Ferreira L. R., Verma S. K., Ying Y., Kwok O. C., Feidas H. and Theodoropoulos G.. Surveillance of feral swine for *Trichinella* spp. and *Toxoplasma gondii* in the USA and host-related factors associated with infection. *Vet Parasitol*, 2014,(205):653-665.
- Hill D. E., Haley C., Wagner B., Gamble H. R. and Dubey J. P.. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the US swine herd using sera collected during the National Animal Health Monitoring Survey (Swine 2006). *Zoonoses Public Health*, 2010,(57):53-59.

- Hou Z. F., Su S. J., Liu D. D., Wang L. L., Jia C. L., Zhao Z. X., Ma Y. F., Li Q. Q., Xu J. J. and Tao J. P.. Prevalence, risk factors and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in sick pigs and stray cats in Jiangsu Province, eastern China. *Infect Genet Evol*, 2018,(60):17-25.
- Hurt C. and Tammaro D.. Diagnostic evaluation of mononucleosis-like illnesses. *The American journal of medicine*, 2007,(120):911.e911-918.
- Ibrahim H. M., Mohamed A. H., El-Sharaawy A. A. and El-Shqanqery H. E.. Molecular and serological prevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women and sheep in Egypt. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 2017,(10):996-1001.
- Jiang H. H., Wang S. C., Huang S. Y., Zhao L., Wang Z. D., Zhu X. Q. and Liu Q.. Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* Isolates from Pigs in Jilin Province, Northeastern China. *Foodborne Pathog Dis*, 2016,(13):88-92.
- Jiang H. H., Zhang W. B., Zhao L., Zhou D. H., Song H. Q., Xu C. M., Deng S. Z. and Zhu X. Q.. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in pigs in Jiangxi Province, Southeastern China. *Foodborne Pathog Dis*, 2014,(11):362-365.
- Jittapalapong S., Sangvaranond A., Pinyopanuwat N., Chimnoi W., Khachaeram W., Koizumi S. and Maruyama S.. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Satun Province, Thailand. *Veterinary Parasitology*, 2005,(127):17-22.
- Jung C., Lee C. Y. and Grigg M. E.. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. *Int J Parasitol*, 2004,(34):285-296.
- Kim J. H., Kang K. I., Kang W. C., Sohn H. J., Jean Y. H., Park B. K., Kim Y. and Kim D. Y.. Porcine abortion outbreak associated with *Toxoplasma gondii* in Jeju Island, Korea. *J Vet Sci*, 2009,(10):147-151.
- Kobayashi S., Shimizu Y., Yamamoto T., Hayama Y., Yamaguchi E., Hanafusa Y. and Osaki M.. First nationwide survey of the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars in Japan. *Parasitol Res*, 2021,(120):1505-1509.
- Lau Y. L. and Fong M. Y.. *Toxoplasma gondii*: serological characterization and immunogenicity of recombinant surface antigen 2 (SAG2) expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Exp Parasitol*, 2008,(119):373-378.
- Li H. L., Dong L., Li Q., Zhang L., Chen J., Zou F. C. and Zhu X. Q.. Seroepidemiology of

- Toxoplasma gondii* infection in Bai and Han ethnic groups in southwestern China. *Epidemiol Infect*, 2015,(143):881-886.
- Li Q., Qin S. Y., Li S., Peng P., Zhao Q., Jia H. L. and Wang C. R.. First Report on *Toxoplasma gondii* Seroprevalence in Free-Ranging Pigs in Northeastern China. *Acta Parasitol*, 2019,(64):295-299.
- Li Y. N., Nie X., Peng Q. Y., Mu X. Q., Zhang M., Tian M. Y. and Min S. J.. Seroprevalence and genotype of *Toxoplasma gondii* in pigs, dogs and cats from Guizhou province, Southwest China. *Parasites & vectors*, 2015,(8):214.
- Lindsay D. S., Collins M. V., Mitchell S. M., Cole R. A., Flick G. J., Wetch C. N., Lindquist A. and Dubey J. P.. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. *J Eukaryot Microbiol*, 2003,(50 Suppl):687-688.
- Liu Q., Jiang W., Chen Y., Zhang M., Geng X. and Wang Q.. Study on Circulating Antigens in Serum of Mice With Experimental Acute *Toxoplasmosis*. *Front Microbiol*, 2020,(11):612252.
- Lopes W. D., Rodriguez J. D., Souza F. A., dos Santos T. R., dos Santos R. S., Rosanese W. M., Lopes W. R., Sakamoto C. A. and da Costa A. J., Sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in sheep. *Vet Parasitol*, 2013,(195):47-56.
- Machado F. P., Kmetiuk L. B., Teider-Junior P. I., Pellizzaro M., Yamakawa A. C., Martins C. M., Bach R. V. W., Morikawa V. M., de Barros-Filho I. R., Langoni H., Dos Santos A. P. and Biondo A. W.. Seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in wild boars (*Sus scrofa*), hunting dogs, and hunters of Brazil. *PLoS One*, 2019,(14):e0223474.
- Majidiani H., Dalimi A., Ghaffarifar F., Pirestani M. and Ghaffari A. D.. Computational probing of *Toxoplasma gondii* major surface antigen 1 (SAG1) for enhanced vaccine design against toxoplasmosis. *Microb Pathog*, 2020,(147):104386.
- McAllister M. M.. A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of "subclinical" *toxoplasmosis*. *Vet Parasitol*, 2005,(132):241-247.
- Messier V., Levesque B., Proulx J. F., Rochette L., Libman M. D., Ward B. J., Serhir B., Couillard M., Ogden N. H., Dewailly E., Hubert B., Dery S., Barthe C., Murphy D. and Dixon B.. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among Nunavik Inuit (Canada). *Zoonoses Public Health*, 2009,(56):188-197.

- Ottaru S., Mirambo M. M., Kabyemera R., Kidenya B. R., Seugendo M., Msanga D. R., Ngoya P., Morona D. and Mshana S. E.. Predictors of *Toxoplasma gondii* IgG Seropositivity and Cranial Ultrasound Patterns among Children with Hydrocephalus. *Int J Pediatr*, 2020,(2020):8326348.
- Pan M., Lyu C., Zhao J. and Shen B.. Sixty Years (1957-2017) of Research on *Toxoplasmosis* in China-An Overview. *Front Microbiol*, 2017,(8):1825.
- Pastiu A. I., Cozma-Petrut A., Mercier A., Balea A., Galal L., Mircean V., Pusta D. L., Bogdan L. and Gyorke A.. Prevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in naturally infected backyard pigs intended for familial consumption in Romania. *Parasites & vectors*, 2019,(12):586.
- Pietkiewicz H., Hiszczyńska-Sawicka E., Kur J., Petersen E., Nielsen H. V., Paul M., Stankiewicz M. and Myjak P.. Usefulness of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (GRA1, GRA7 and SAG1) in an immunoglobulin G avidity test for the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Parasitology Research*, 2006,(100):333-337.
- Pipia A. P., Varcasia A., Dessi G., Panzalis R., Gai C., Nonnis F., Veronesi F., Tamponi C. and Scala A.. Seroepidemiological and biomolecular survey on *Toxoplasma gondii* infection on organic pig farms. *Parasitol Res*, 2018,(117):1637-1641.
- Powell L. F., Cheney T. E., Williamson S., Guy E., Smith R. P. and Davies R. H.. A prevalence study of *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Toxoplasma gondii* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in UK pigs at slaughter. *Epidemiol Infect*, 2016,(144):1538-1549.
- Raue K., Heuer L., Bohm C., Wolken S., Epe C. and Strube C.. 10-year parasitological examination results (2003 to 2012) of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, rabbits and hedgehogs. *Parasitol Res*, 2017,(116):3315-3330.
- Rocha-Roa C., Molina D. and Cardona N.. A Perspective on Thiazolidinone Scaffold Development as a New Therapeutic Strategy for *Toxoplasmosis*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018,(8):360.
- Rostami A., Riahi S. M., Fakhri Y., Saber V., Hanifehpour H., Valizadeh S., Gholizadeh M., Pouya R. H. and Gamble H. R.. The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among wild boars: A systematic review and meta-analysis. *Vet Parasitol*, 2017,(244):12-20.

- Scallan E., Hoekstra R. M., Mahon B. E., Jones T. F. and Griffin P. M.. An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years. *Epidemiol Infect*, 2015,(143):2795-2804.
- Song K. J., Yang Z., Chong C. K., Kim J. S., Lee K. C., Kim T. S. and Nam H. W.. A rapid diagnostic test for toxoplasmosis using recombinant antigenic N-terminal half of SAG1 linked with intrinsically unstructured domain of gra2 protein. *Korean J Parasitol*, 2013,(51):503-510.
- Su R., Dong H., Li T., Jiang Y., Yuan Z., Su C., Zhang L. and Yang Y.. *Toxoplasma gondii* in four captive kangaroos (*Macropus* spp.) in China: Isolation of a strain of a new genotype from an eastern grey kangaroo (*Macropus giganteus*). *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 2019,(8):234-239.
- Swanenburg M., Gonzales J. L., Bouwknecht M., Boender G. J., Oorburg D., Heres L. and Wisselink H. J.. Large-scale serological screening of slaughter pigs for *Toxoplasma gondii* infections in The Netherlands during five years (2012–2016): Trends in seroprevalence over years, seasons, regions and farming systems. *Veterinary Parasitology*, 2019,(276).
- Torgerson P. R., Devleeschauwer B., Praet N., Speybroeck N., Willingham A. L., Kasuga F., Rokni M. B., Zhou X. N., Fevre E. M., Sripa B., Gargouri N., Furst T., Budke C. M., Carabin H., Kirk M. D., Angulo F. J., Havelaar A. and de Silva N.. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Med*, 2015,(12):e1001920.
- Vitale M., Tumino G., Partanna S., La Chiusa S., Mancuso G., Giglia M. L. and Presti V. D.. Impact of traditional practices on food safety: a case of acute *toxoplasmosis* related to the consumption of contaminated raw pork sausage in Italy. *J Food Prot*, 2014,(77):643-646.
- Wang D., Liu Y., Jiang T., Zhang G., Yuan G., He J., Su C. and Yang N.. Seroprevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from pigs intended for human consumption in Liaoning province, northeastern China. *Parasites & vectors*, 2016,(9):248.
- Wang H., Wang T., Luo Q., Huo X., Wang L., Liu T., Xu X., Wang Y., Lu F., Lun Z., Yu L. and Shen J.. Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in pork from retail meat stores in Eastern China. *Int J Food Microbiol*, 2012,(157):393-397.
- Wang H., Zhang L., Ren Q., Yu F. and Yang Y.. Diagnosis of Swine *Toxoplasmosis* by PCR

- and Genotyping of *Toxoplasma gondii* from pigs in Henan, Central China. *BMC veterinary research*, 2017,(13):152.
- Wang W., Gong Q. L., Li M. H., Wei X. Y., Chen Y., Jiang J., Ni H. B., Lyu C. and Wang C. R.. The prevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep in China: A systematic review and meta-analysis. *Res Vet Sci*, 2021,(138):19-29.
- Wang Z. D., Liu H. H., Ma Z. X., Ma H. Y., Li Z. Y., Yang Z. B., Zhu X. Q., Xu B., Wei F. and Liu Q.. *Toxoplasma gondii* Infection in Immunocompromised Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Microbiol*, 2017,(8):389.
- Wu D., Lv R., Sun X., Shu F., Zhou Z., Nie K., Duan G. and Zou F.. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from slaughter pigs in Chongqing, China. *Trop Anim Health Prod*, 2012,(44):685-687.
- Wu K., Chen X. G., Li H., Yan H., Yang P. L., Lun Z. R. and Zhu X. Q.. Diagnosis of human toxoplasmosis by using the recombinant truncated surface antigen 1 of *Toxoplasma gondii*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2009,(64):261-266.
- Xiao C., Li C., Di D., Cappelle J., Liu L., Wang X., Pang L., Xu J., Liu K., Li B., Shao D., Qiu Y., Ren W., Widen F., Chevalier V., Wei J., Wu X. and Ma Z.. Differential replication efficiencies between Japanese encephalitis virus genotype I and III in avian cultured cells and young domestic ducklings. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018,(12):e0007046.
- Yan C., Liang L. J., Zheng K. Y. and Zhu X. Q.. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & vectors*, 2016,(9):137.
- Yang Y., Feng Y., Yao Q., Wang Y., Lu Y., Liang H., Zhu X. and Zhang L.. Seroprevalence, Isolation, Genotyping, and Pathogenicity of *Toxoplasma gondii* Strains from Sheep in China. *Front Microbiol*, 2017,(8):136.
- Zhang J., Gu Q., Hou X., Zhou H., Cong H., Li Y., Zhao Q. and Li S.. Identification of a necessary element for *Toxoplasma gondii* SAG1 gene expression. *Exp Parasitol*, 2007,(116):175-181.
- Zhang X., Liu J., Li M., Fu Y., Zhang T., Han Q. and Liu Q.. Role of an estradiol regulatory factor-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) in *Toxoplasma gondii* infection and pathogenicity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*,

2017,(174):176-182.

Zhang X., Zhang H., Fu Y., Liu J. and Liu Q.. Effects of Estradiol and Progesterone-Induced Intracellular Calcium Fluxes on *Toxoplasma gondii* Gliding, Microneme Secretion, and Egress. *Front Microbiol*, 2018,(9):1266.

Zhang X. X., Ren W. X., Tan Q. D., Hou G., Fei Y. C., Zhao L. J., Zhao Q. and Sun D.. Meta-analysis of *Toxoplasma gondii* in pigs intended for human consumption in Mainland China. *Acta Trop*, 2019,(198):105081.

Zhang Y., Gong H., Mi R., Huang Y., Han X., Xia L., Li S., Jia H., Zhang X., Sun T., Wang X. and Chen Z.. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in slaughter pigs in Shanghai, China. *Parasitol Int*, 2020,(76):102094.

Zou F. C., Sun X. T., Xie Y. J., Li B., Zhao G. H., Duan G. and Zhu X. Q.. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs in southwestern China. *Parasitol Int*, 2009,(58):306-307.

致谢

毕业论文写到最后，看着背后安静地学习室和忙碌的实验室，每一位同学都在认真的完成自己的学习任务，此刻的内心五味杂陈。时光荏苒，岁月流逝，两年的研究生生活居然转眼间就要结束，此刻我的内心无比不舍。

首先，特别感谢我的恩师张晓副教授，在科研上，张老师做事严格睿智，对待科研的态度积极认真，在学习上张老师给了我巨大的帮助，从课题讨论到实验安排再到论文的写作，张老师总是像朋友一样和我们积极讨论，帮我解决科研上的所有问题。生活中，张老师待人亲和，不光对我们的学习上心，对我们的生活也非常关心。本论文从选题到完成，每一步都在张老师的指导下完成，倾注了老师大量的心血，再次向张老师表示崇高的敬意和诚挚的感谢。同时也要感谢赵孝民教授和李宏梅副教授在我这两年的研究生生活中对我的帮助及鼓励。赵老师知识渊博，耐心宽容，对待科研谨慎认真，待人和蔼可亲，科研上有什么问题跟他请教总能收获不一样的思路，两年的研究生生活让我在学习上与思想上均受益匪浅。李老师一直像妈妈一样温柔可亲，无微不至，每次无论科研上还是生活中，如果遇到一些很小的事情，李老师总能够准确地记在心上，给我们提供新的科研思路，帮我一起解决实验上得问题，和我们谈心交流，给了我很大的鼓励和信心。

其次，我想感谢山东农业大学我敬爱的母校，感谢学校的老师领导们为我们提供这么优越的学习条件和生活环境，感谢动物科技学院的每一位老师的辛勤努力，感谢你们对我们无怨无悔的付出与培养。祝愿母校在未来的日子里蓬勃发展，也祝愿动物科技学院越来越好。

我要感谢我们实验室这个大家庭，感谢孙玲玉、谭倩倩、姜盈盈、肖倩倩、李慧慧等师姐，感谢王炳祥、王晋文等师兄，感谢同级陈俊朋、陈笑、李金璇、孙晋坤、吴智远、李俞锋等同学，感谢张镇钊师弟，吴红霞师妹等全体家人们，谢谢大家这两年的陪伴，谢谢你们给予我生活上学习上的所有帮助，感恩遇见你们所有人，谢谢你们成为我生命中绚丽的一抹。愿我们越努力越幸运，顶峰见。

最后，我要感谢我的家人们，感谢家庭群里的每一位亲人给我的关心和支持，尤其是我的父母和妹妹，谢谢你们自始至终的支持，谢谢你们给我全部的爱，今后我将

带着这全部的爱继续前行。再次感谢我的家人们，愿你们春夏秋冬身体健康，一年四季平安顺遂。

攻读学位期间发表论文章况

- Liu X.**, Fan L., Tan Q., Chen X., Li H., Zhao X. and Zhang X., Prevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs determined by ELISA based on recombinant SAG1 in Shandong province, China. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2022 Apr;(83):101781.
- Tan Q., Wang J., Chen J., **Liu X.**, Chen X., Xiao Q., Li J., Li H., Zhao X. and Zhang X., Involvement of Urm1, a Ubiquitin-Like Protein, in the Regulation of Oxidative Stress Response of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Spectr*, 2022,(e0239421).
- Wang J., Tan Q., Chen J., **Liu X.**, Di Z., Xiao Q.,Li J., Zhao X. and Zhang X., Alkyl Hydroperoxide Reductase as a Determinant of Parasite Antiperoxide Response in *Toxoplasma gondii*. *Oxid Med Cell Longev*, 2021 Sep 21;2021:1675652.
- Chen X, Sun P, Chen J, Tan Q, Li J, **Liu X**, Xiao Q, Li H, Zhao X, Zhao N and Zhang X. Epidemiological investigation and reinfection evaluation of *Toxoplasma gondii* in chickens in Shandong province, China. *Exp Parasitol*. 2022 July;(238):108276.