

以半巢式聚合酶連鎖反應方法調查台北市立動物園動物受弓漿蟲感染之情形

Investigation of *Toxoplasma gondii* Infection in Animals in Taipei Zoo Using Semi-nest Polymerase Chain Reaction

余子安¹ 劉祉吟¹ 蒲長恩² 陳啟聰² 趙齊相² 余珍芳³ 王儷蓓^{1,*}

Zih-An Yu¹, Chih-Yin Liu¹, Chang-En Pu², Chi-Tsong Chen², Chi-Hsiang Chao²,
Jane-Fang Yu³, Lih-Chiann Wang^{1,*}

¹ 國立台灣大學獸醫專業學院 10617 台北市羅斯福路四段 1 號

² 法務部調查局 23149 新北市新店區中華路 74 號

³ 台北市立動物園 11656 台北市文山區新光路二段 30 號

¹ School of Veterinary Medicine, National Taiwan University

² Scientific and Technical Research Center, Ministry Justice Investigation Bureau

³ Taipei Zoo

*通訊作者：lcwang@ntu.edu.tw

*Corresponding author: lcwang@ntu.edu.tw

摘 要

弓漿蟲可感染所有鳥類和哺乳類，也是重要的人畜共通傳染病。台北市立動物園動物物種繁多，遊客人數眾多，因此動物感染弓漿蟲的狀況是個有待研究的課題。本研究收集 1999-2001 年間於台北市立動物園死亡動物肌肉組織之去氧核醣核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA)，共計 171 隻個體，橫跨 89 個種別。我們鎖定弓漿蟲 *BI* 基因，以半巢式聚合酶連鎖反應增幅；電泳檢視增幅結果，若出現疑似弓漿蟲感染陽性的條帶，再以定序以及序列比對方法確診，目的在於調查這些動物受到弓漿蟲感染的情況。結果共有 14 隻個體之電泳結果呈現疑似陽性，佔 8.2%，包括 7 隻綠簑鴿、1 隻維多利亞冠鴿、1 隻食火雞、1 隻大紅鶴、1 隻小紅鶴、1 隻智利紅鶴、1 隻灰袋鼠與 1 隻兔

子。其中有 2 隻個體定序成功，分別為灰袋鼠和維多利亞冠鴿，基因序列經比對確為弓漿蟲。本研究的結果，確認了動物園動物感染弓漿蟲的情況，希望提供園方在疾病防治上的參考。

Abstract

Toxoplasma gondii is an important zoonotic agent that can infect all species of birds and mammals. Toxoplasmosis should be an important research subject in Taipei Zoo for the large number of animals the Zoo houses and visitors it receives all year-round. Muscle samples from dead animal bodies covering 171 individuals from 89 species were collected in Taipei Zoo from 1999 to 2001. DNA was extracted and the toxoplasma *BI* gene was amplified using semi-nest polymerase chain reaction. Further gene sequencing and gene aligning and analysis were performed for the positive samples. There were 14 animals (8.2%) showing suspected positive PCR results, including seven nicobar pigeons (*Caloenas nicobarica*), one victoria crowned pigeon (*Goura Victoria*), one southern cassowary (*Casuarius casuarius*), one great flamingo (*Phoenicopterus ruber*), one lesser flamingo (*Phoenicopterus minor*), one Chilean flamingo (*Phoenicopterus chilensis*), one eastern gray kangaroo (*Macropus giganteus*) and one domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Among these 14 samples, two samples, specifically from gray kangaroo and victoria crowned pigeon, were successfully sequenced and confirmed to be afflicted by *Toxoplasma gondii*. The study proved the occurrence of toxoplasma infection in animals in Taipei Zoo, and the result can be used as a reference for disease diagnosis and prevention.

關鍵詞：半巢式聚合酶連鎖反應、弓漿蟲、動物園

Key words: semi-nest polymerase chain reaction, *Toxoplasma gondii*, zoo

收件日期：2015 年 07 月 14 日 接受日期：2015 年 11 月 17 日

Received: July 14, 2015

Accepted: November 17, 2015

緒 言

弓漿蟲(*Toxoplasma gondii*)是一種絕對細胞內寄生的肉包子蟲科(Sarcocystidae)原蟲(protozoan)，其感染所引發之疾病稱為弓蟲症(Toxoplasmosis)，為重要人畜共通傳染病，在

世界各地均有案例出現。目前已知弓漿蟲可感染所有鳥類和哺乳類(Dubey 2009)，因此在公共衛生以及獸醫學領域上為重要的研究對象。

動物園是人類可能與動物接觸的場所。台北市立動物園有大量的入園人數。此外，動物

園時常有流浪貓和無人飼養的家鴿出沒，此二者在弓漿蟲的散佈中扮演重要角色，尤其貓科動物為弓漿蟲發育成性成熟個體所需的唯一最終宿主(Dubey 2009)。另外，動物園內物種繁多，雖然免疫健全的動物受到弓漿蟲感染時，多數沒有臨床症狀，但研究指出，某一些物種對弓漿蟲感染特別敏感，會引發嚴重症狀，例如：袋鼠科(Macropodidae)以及鴿形目(Columbiformes)動物 (Moré *et al.* 2010; Miller *et al.* 2003; Dubey *et al.* 2002)。

弓漿蟲診斷的方法包括有：1.弓漿蟲蟲體之直接證明或弓漿蟲蟲體之檢出為最正確之診斷黃金準則，其次為檢查其特異性之 IgM 抗體。2.小白鼠腹腔接種陽性病材，一週後自病鼠之腹水可檢出蟲體。3.色素試驗及直接凝集試驗，兩者診斷效率相近。4.免疫螢光法(Immunofluorescence Assay, IFA)、免疫擴散法(immunodiffusion)及免疫組織化學染色法(Immunohistochemistry, IHC)。5.酵素連結免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)及聚合酶連鎖反應方法(polymerase chain reaction, PCR)(劉等 2009)。

聚合酶連鎖反應方法非常敏感，可以偵測到神經或肌肉組織一個弓漿蟲速殖體(tachyzoite)的 DNA，專一性高，特別適合臨床檢體的快速診斷之用；巢式聚合酶連鎖反應則更增加其敏感度。缺點是可能有交叉污染的發生(Dubey 2009)。

目前以含有 35 個重覆片段的 B1 基因(Burg *et al.* 1989)以及一個含有 300 個重覆片段 529bp 大小的 element (Homan *et al.* 2000)最常作為聚合酶連鎖反應的增幅標的。

當感染的貓隻糞便排出弓漿蟲卵囊(fecal oocysts)，被動物食入，卵囊芽孢化的孢子蟲(sporocysts)分裂為速殖體(tachyzoites)，即在該

動物的神經與肌肉組織形成組織囊包(tissue cyst)，並發育成囊包緩殖體(bradyzoites) (劉等 2009)。感染弓漿蟲的動物，其肌肉組織和神經組織表現最多組織囊包，採樣時可選擇腦、眼、骨骼肌和心肌 (Dubey 2009)。我們選擇肌肉組織作為檢體，其優勢在於肌肉組織內含組織囊包的機率高，聚合酶連鎖反應具診斷意義，缺點在於可能取樣到不具囊包的肌肉組織而無法診斷。

本研究調查 1999-2001 年間，於台北市立動物園死亡的動物，受到弓漿蟲感染之情況；以巢式聚合酶連鎖反應增幅弓漿蟲 B1 基因作為檢測肌肉樣本弓漿蟲的方法，並以基因定序和序列比對的方式來確診弓漿蟲。希望能藉此了解台北市立動物園動物感染弓漿蟲的情況，作為疾病診斷與預防的參考。

材料與方法

一、樣本來源

本實驗樣本為 1999-2001 年間台北市立動物園死亡動物隨機採樣的肌肉塊檢體，包含哺乳綱動物 51 種計 88 隻、鳥綱動物 36 種計 81 隻、爬蟲綱動物 1 種 1 隻和兩棲綱動物 1 種 1 隻，共計 89 種動物 171 隻，保存於 -80°C。於 2014 年萃取 DNA，以分光光度計(spectrophotometer, WPA UV1101, Biochrom, Cambridge, UK)測得 DNA 濃度介於 1 至 337.7 ng/ μ l 之間，並保存於 -80°C。陰性控制組的 DNA 模板是以二次過濾水代替，陽性控制組樣本來源，為感染弓漿蟲的灰袋鼠肌肉檢體經過基因選殖得到弓漿蟲質體 DNA。

二、核酸引子

弓漿蟲引子 (ToxoB1 1576 F, ToxoB1

2000R 以及 ToxoB1 1995R)為參考前人之研究文獻(Sakae *et al.* 2012)，以半巢式聚合酶連鎖反應(semi-nested PCR)進行增幅，最後產物核酸片段大小為 419 bp。

三、聚合酶連鎖反應

使用半巢式聚合酶連鎖反應的方法。第一次增幅過程中將 5 μ l 模板 DNA 加入 5 μ l 10 X PCR buffer, 4 μ l 2.5mM dNTP, 2 μ l 10 μ M ToxoB1 1576 F primer, 2 μ l 10 μ M ToxoB1 2000R primer, 0.3 μ l GenTaq Plus (5U/ μ l) 以及二次蒸餾水 31.7 μ l，使總體積為 50 μ l。置於聚合酶連鎖反應儀 (T GRADIENT, Biometra GmbH, Germany)，增幅過程為：94°C 加熱 5 分鐘，再進行 94°C 30 秒、56°C 30 秒、72°C 30 秒共 35 循環，最後於 72°C 持續 2 分鐘，增幅完成後保存於 4°C，以備進行第二階段增幅。第二階段增幅中，以第一階段產物作為模板 DNA，取 1 μ l 加入 5 μ l 10X PCR buffer, 4 μ l 2.5mM dNTP, 2 μ l 10 μ M ToxoB1 1576 F primer, 2 μ l 10 μ M ToxoB1 1995R primer, 0.3 μ l GenTaq Plus (5U/ μ l) 以及二次蒸餾水 35.7 μ l，使總體積為 50 μ l。增幅過程與第一次相同，增幅完成後保存於 4°C，以備進行膠體電泳分析。

四、電泳分析

瓊脂凝膠濃度為 1.5%，內含 0.02% Ethidium bromide (1mg/ml)，取半巢式聚合酶連鎖反應之產物 15 μ l，於 100 伏特電壓下電泳 35 到 40 分鐘，電泳完成後利用紫外光觀察其結果並照相記錄。

五、定序與序列比對

電泳分析疑似為陽性反應之 DNA 條帶，經切割後，以瓊脂凝膠 DNA 萃取套組 (QIAquick, QIAGEN, Netherlands) 萃取，產物交由源資國際生物科技股份有限公司（台北，台灣）進行定序。定序結果於 NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上進行 Blast 分析，以確定是否為弓漿蟲的基因。

結果

根據 PCR 分析的結果，在 171 隻動物肌肉檢體中，弓漿蟲感染疑似陽性的動物共有 14 隻，佔所有死亡動物的 8.2% (14/171)，其中包括 7 隻綠簍鴿、1 隻維多利亞冠鴿、1 隻食火雞、1 隻大紅鶴、1 隻小紅鶴、1 隻智利紅鶴、1 隻灰袋鼠與 1 隻兔子（圖 1 及圖 2）。在疑似弓漿蟲感染陽性的動物中，鳥類佔所有測試鳥綱動物的 14.8% (12/81)，哺乳動物佔所有測試哺乳綱動物的 2.3% (2/88)。鳥類中又以綠簍鴿佔最大比例 58.3% (7/12)。鳥類比例高懷疑與動物園鳥類食物的餵食大多撒在泥土地上有關，相對帶來的野鼠多，野貓也跟著多起來。14 隻 PCR 陽性動物之 DNA 產物皆進行雙向定序，有 2 隻定序成功，包括一隻灰袋鼠和一隻維多利亞冠鴿，其定序結果經過 NCBI 基因庫基因序列比對分析之後，與一 RH 品系弓漿蟲 (Burg *et al.* 1989) 的 BI 基因序列分別有 98.7% 以及 98.9% 的相似度，因此確診受到弓漿蟲感染（圖 3）。

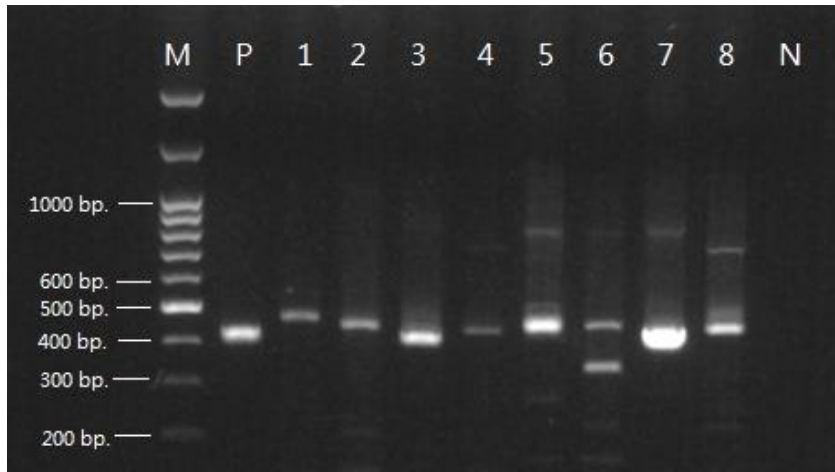


圖 1. 電泳分析疑似為陽性之樣本。M: 100 bp 梯狀標誌；P: 陽性對照；N: 陰性對照；Lane 1: 食火雞；Lane 2: 小紅鶴；Lane 3: 維多利亞冠鴿；Lane 4: 綠裳鴿；Lane 5: 歐洲大紅鶴；Lane 6: 智利紅鶴；Lane 7: 灰袋鼠；Lane 8: 綠裳鴿 (不同個體)。

Fig. 1. The suspected positive PCR samples. M: 100 bp ladder marker; P: positive control; N: negative control. Lane1: southern cassowary; Lane2: lesser flamingo; Lane 3: victoria crowned pigeon; Lane 4: nicobar pigeon; Lane 5: great flamingo; Lane 6: Chilean flamingo; Lane 7: gray kangaroo; Lane 8: nicobar pigeon (different individual).

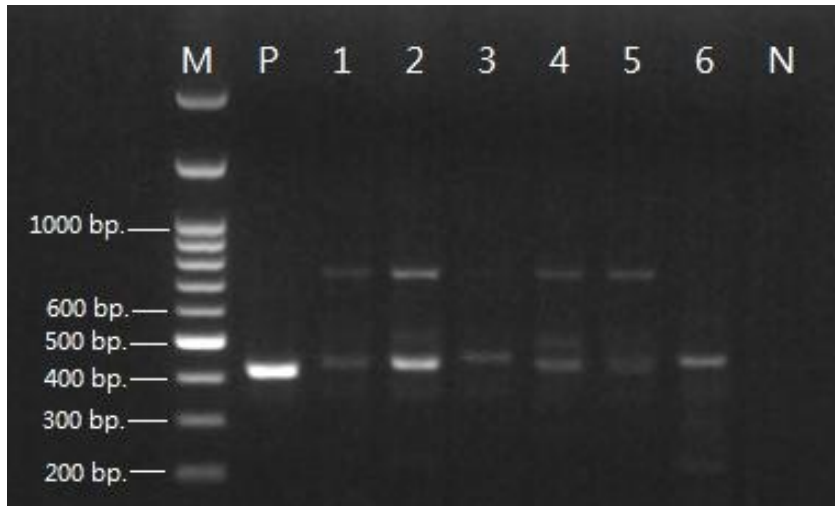


圖 2. 電泳分析疑似為陽性之樣本。M: 100 bp 梯狀標誌；P: 陽性對照；N: 陰性對照；Lane1 至 Lane 5: 不同個體的綠裳鴿；Lane 6: 兔。

Fig. 2. The suspected positive PCR samples. M: 100 bp ladder marker; P: positive control; N: negative control. Lane1-5: different nicobar pigeon individuals; Lane 6: domestic rabbit.

| | | | | | | |
|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
| | -----+-----+-----+-----+-----+ | | | | | |
| F9 | TGCACCTTTCGGACCTCAACAACCGTGCAAAAGGATCGCCATCTGGTGTG | | | | | 50 |
| I22 | -----C..... | | | | | 41 |
| | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | |
| | -----+-----+-----+-----+-----+ | | | | | |
| F9 | TCTTCAAGCGTCAAAACGAACTATCTGTATATCTCTCAAGGAGGACTGGC | | | | | 100 |
| I22 | | | | | | 91 |
| | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | |
| | -----+-----+-----+-----+-----+ | | | | | |
| F9 | AACCTGGTGTGCGACAACAGAACAGCTGCAGTCCGGAAATAGAAAGCCATG | | | | | 150 |
| I22 | | | | | | 141 |
| | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | |
| | -----+-----+-----+-----+-----+ | | | | | |
| F9 | AGGCACTCCAACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGATACAAACTGCTAAACG | | | | | 200 |
| I22 | | | | | | 191 |
| | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | |
| | -----+-----+-----+-----+-----+ | | | | | |
| F9 | GTCCGGGTGAAACAATAGAGAGTACTAGAACGTCGCCGTTACTGCCCAGT | | | | | 250 |
| I22 | | | | | | 241 |
| | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | |
| | -----+-----+-----+-----+-----+ | | | | | |
| F9 | TGTCATGCCATTGACGTAGACCCAGAAATGAGGCGAGAAATTAATATTGT | | | | | 300 |
| I22 |----- | | | | | 275 |
| | ----- | | | | | |
| F9 | T | | | | | 301 |
| I22 | - | | | | | |

圖 3. DNA 定序結果。F9: 維多利亞冠鴿；I22: 灰袋鼠。點狀符號代表相同鹼基，破折號為 I22 定序後因訊號雜亂而無法判讀之區域。

Fig. 3. The DNA sequencing result. F9: victoria crowned pigeon; I22: gray kangaroo. The dot symbolizes the same deoxyribonucleic acid base and the dash symbolizes clutter signal whose base could not be read.

討論

動物園是一個人類與動物接觸頻繁的地方，根據台北市立動物園的統計，在民國 88 至 90 年每年的入園人數約有五百萬人，入園人數隨著季節有所變動，1、2 月和 7、8 月的人潮又較其他月份多。台灣地處亞熱帶，溫暖和潮濕利於弓漿蟲卵囊 (oocyst) 的產孢 (sporulate)，而且研究也顯示在 6°C-36°C 的環境中，弓漿蟲卵囊可以存活達 46 天 (Dubey 2009)，因此弓漿蟲在人和動物之間的傳播是值得被考量的公共衛生議題。

弓漿蟲感染野生或圈養的有袋類動物會造成高死亡率。受感染的動物可能出現的臨床症狀包括：下痢、呼吸困難、活動力下降、體重減輕、眼盲或神經損傷 (Miller *et al.* 2003)。紅袋鼠和灰袋鼠感染弓漿蟲會出現沉鬱和突然死亡 (Moré *et al.* 2010)。鵠形目動物感染弓漿蟲所表現出的臨床症狀包括：厭食、消瘦、遲鈍甚至無法維持平衡，尤其是冠鵠類會出現嚴重的弓蟲症 (Dubey 2002)。弓蟲症可以使用 sulfadiazine-pyrimethamine 或 clindamycin 來治療 (Miller *et al.* 2003)。本實驗所檢出的灰袋鼠與維多利亞冠鵠，雖然死亡前的臨床症狀已不可考，但當時皆未確診為弓漿蟲的感染。本實驗的結果，將有助於疾病診斷與治療的參考。由於本研究是蒐集 1999-2001 年間台北市立動物庫存之死亡動物的肌肉樣本，當時並未考慮到弓漿蟲的研究之用。然而對於生前臨床症狀懷疑有弓漿蟲感染的案例，除肌肉組織外，動物的淋巴組織及神經系統應列為優先的採樣樣本，以利於診斷之用。

本實驗所增幅出弓漿蟲核酸產物正確大小為 419 bp，疑似陽性的檢體 PCR 產物大小均落在 419 bp 附近，故稱為疑似陽性。大部分

定序失敗的原因是因為 PCR 增幅出來的產物量太少² (電泳膠條帶微弱)，所以不足以成功定序。這可以從 2 隻成功定序的動物在電泳膠上條帶濃厚得到印證 (圖 1 Lane 3 and 7)。而 PCR 增幅產量少的原因可能是該肌肉樣本原本所含的弓蟲組織囊包量就很低。其他定序失敗的原因是因為定序波峰雜訊太多難以判讀，推測 PCR 產物非單一片段的產物² (雖然在膠上看起來是連合在一起的一個條帶)。這也說明了疑似陽性者，不一定就是沒有感染。故了解疑似感染陽性動物比率或許可以得到一個動物感染可能的概況，雖然無法明確的證實。

定序成功的灰袋鼠和維多利亞冠鵠的序列經比對分析，發現與一 RH 品系弓漿蟲 (Burg *et al.*, 1989) 相似度接近 100%，RH 品系屬於基因型 I，在小鼠毒性明顯強於其他兩個基因型：基因型 II 和基因型 III (Su *et al.* 2006)。由灰袋鼠和維多利亞冠鵠組織中檢測到的弓漿蟲是否屬於基因型 I，還需要其他分型方法以及標記方法確認，例如：multilocus PCR-RFLP markers (Su *et al.* 2006) 或 microsatellite markers (Ajzenberg *et al.* 2005)，這是我們或後人可以繼續努力的方向。

過去文獻 (de Camps *et al.* 2008; Choi *et al.* 1987; Murata 1989; Sedlá k and Bárto vá 2006; Silva *et al.* 2001) 對動物園的弓漿蟲感染調查以血清學方法為主。PCR 多使用於單一物種零星個體出現臨床症狀或死亡，經屍解懷疑是弓漿蟲之時確診之用 (Basso *et al.* 2005; Harrison *et al.* 2007; Kenny *et al.* 2002; Sedlá k *et al.* 2004)，同時亦會配合細胞培養 (Basso *et al.* 2007)、病理學 (Harrison *et al.* 2007; Kenny *et al.* 2002; Peláez *et al.* 2011; Sedlá k *et al.* 2004) 和生物分析 (Pena *et al.* 2011) 等來共同診斷。

在 de Camps 等作者的美國動物園動物血清學弓漿蟲調查中，檢測出紅袋鼠的陽性率高達 61.8% (de Camps *et al.* 2008)。Murata 亦發現在日本動物園 25 隻紅袋鼠的血清樣本中有 2 隻呈現陽性(Murata 1989)。Parameswaran 等作者以 PCR 方法檢測了澳洲地區有袋類動物的組織樣本(腦、心和舌)，發現 46 隻中有 12 隻陽性(Parameswaran *et al.* 2010)。這些研究顯示出袋鼠具有較高的感染率，此與我們 PCR 的結果相應。至於鳥綱動物，Murata 的血清學調查結果顯示紅鶴科鳥類陽性率較其他鳥綱物種高 (14.8%) (Murata 1989)；而我們 PCR 研究的結果是紅鶴科的疑似陽性率佔所有鳥綱動物的 3.7% (3/81)。

不同於前人研究中的血清學檢測，本研究的檢體是從死亡動物的肌肉中萃取出來的 DNA，以半巢式聚合酶連鎖反應和定序的方式直接診斷肌肉組織的弓漿蟲。此外，相較於前人研究中貓科動物都有一定的血清盛行率，本研究所有的貓科動物肌肉檢體皆呈現 PCR 陰性結果；此可能由於貓多為不顯性感染的帶原者，即使感染其肌肉組織亦未帶有弓漿蟲的組織囊包 (tissue cyst)，所以未被檢出。另外由於本研究檢測的樣本是肌肉，採樣方法為任意隨機採樣，故因此不一定採到包含組織囊包的肌肉塊，造成檢測結果的偽陰性，因此動物實際的感染率可能更高。因此如果能夠配合動物生前血清學測試，應能更能提供動物園動物弓蟲感染的全貌。

人類可能藉由食入未煮熟的肉類或青菜而感染弓漿蟲¹ 的肉食動物感染弓漿蟲可能來自生肉中的組織囊包，而草食動物則是食用受到卵囊污染的蔬果 (Sedlák and Bártová 2006)，因此清洗蔬果可能對減少弓漿蟲感染有幫助 (de Camps *et al.* 2008)。污染食用蔬果的

卵囊可能來自於流浪貓 (Sedlák and Bártová 2006)，台北市流浪貓的弓漿蟲血清盛行率有 37% (Lin *et al.* 1998)，在弓漿蟲傳播上應被重視。

另有一篇研究指出台灣作為賽鴿用途之家鴿 (*Columba livia*) 的弓漿蟲血清有一定的盛行率 (Tsai *et al.* 2006)，暗示這種主要在地上啄食的鴿類容易感染弓漿蟲，此與本研究佔 PCR 陽性多數的綠賽鴿及一隻弓漿蟲序列確診的維多利亞冠鴿的狀況不謀而合。

由本研究確診的灰袋鼠和維多利亞冠鴿的食性作分析，前者的感染可能是因為過往動物園食物調配中心週邊有數量不少的流浪貓，蔬果經貓糞的卵囊所汙染且未清洗；而後者的感染可能與冠鴿在泥土地上的啄食行為有關，該飼養場常因動物吃剩的食物引來野鼠，相對的野貓也多起來。因此建議蔬果經過清洗 (劉等 2009) 再餵食動物，動物吃剩的食物要當天清理不要過夜招致鼠類，野貓則要驅離 (劉等 2009)。有文獻指出以 50krads 的能量的輻射照射，可以消滅弓漿蟲卵囊 (Dubey *et al.* 1996 ; Dubey *et al.* 1998)。另外用來清掃環境的掃帚、鏟子和其他器械應該高壓滅菌消毒或加熱 70°C 10 分鐘以上，以杜絕傳染媒介 (Dubey 2009)。

引用文獻

¹ <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/>

² http://www.ibms.sinica.edu.tw/core/sequence/web/main08-3.html#html6_3q6

劉振軒、張淑美、蔡明翰、李細祥。2009。第八十一章弓形蟲感染症。人畜共通傳染病臨床指引第二版。行政院衛生署疾病管制局出版。343-347 頁。

- Ajzenberg, D., A. Dumètre and M. L. Dardé. 2005. Multiplex PCR for Typing Strains of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 1940-1943.
- Basso, W., M. C. Venturini, G. More', A. Quiroga, D. Bacigalupe, J. M. Unzaga, A. Larsen, R. Laplace and L. Venturini. 2007. Toxoplasmosis in captive Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus*) in Argentina. *Veterinary Parasitology* 144: 157-161.
- Basso, W., R. Edelhofer, W. Zenker, K. Möstl, A. Kübber-Heiss and H. Prosl. 2005. Toxoplasmosis in Pallas' cats (*Otocolobus manul*) raised in captivity. *Parasitology* 130: 293-299.
- Burg, J. L., M. G. Christopher, P. Pouletty and J. C. Boothroyd. 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 27: 1787-1792.
- Choi, W. Y., J. E. Yoo, H. W. Nam, C. Y. Oh, S. W. Kim, K. Katakura and A. Kobayashi. 1987. Toxoplasma antibodies by indirect latex agglutination tests in zoo animals. *The Korean Journal of Parasitology* 25: 13-23.
- de Camps, S., J. P. Dubey and W. J. Saville. 2008. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in Zoo Animals in Selected Zoos in the Midwestern United States. *Journal of Parasitology* 94: 648-653.
- Dubey, J. P. 2002. A review of toxoplasmosis in wild birds. *Veterinary Parasitology* 106: 121-153.
- Dubey, J. P. 2009. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2nd ed. Beltsville, Maryland. pp1-72.
- Dubey, J. P., J. K. Lunney, S. K. Shen and O. C. H. Kwok. 1998. Immunity to toxoplasmosis in pigs fed irradiated *Toxoplasma gondii* oocyst. *Journal of Parasitology* 84:749-752.
- Dubey, J. P., M. C. Jenkins, D. W. Thayer, O. C. H. Kwok and S. K. Shen. 1996. Killing of *Toxoplasma gondii* oocysts by irradiation and protective immunity induced by vaccination with irradiated oocysts. *Journal of Parasitology* 82:724-727.
- Harrison, T. M., J. B. Moorman, S. R. Bolin, N. L. Grosjean, A. Lim and S. D. Fitzgerald. 2007. *Toxoplasma gondii* in an African crested porcupine (*Hystrix cristata*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19: 191-194.
- Homan, W. L., M. Vercammen, J. de Braekeleer and H. Verschueren. 2000. Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529bpDNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *International Journal for Parasitology* 30: 67-95.
- Kenny, D. E., M. R. Lappin, F. Knightly, J. Baier, M. Brewer and D. M. Getzy. 2002. Toxoplasmosis in Pallas' Cats (*Otocolobus Felis Manul*) at The Denver Zoological Gardens. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 33: 131-138.
- Lin, D. S., A. C. Y. Fei, H. M. Chow, K. M. Mo and Y.M. Pong. 1998. Prevalences of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats and

- humans in Taipei, Taiwan. *Biological Bulletin of NTNU* 33: 95-103.
- Miller, D. S., C. Faulkner and S. Patton. 2003. Detection of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in juvenile great grey kangaroos, *Macropus giganteus giganteus*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 34: 189-193.
- Moré, G., L. Pardini, W. Basso, M. Machuca, D. Bacigalupe, M.C. Villanueva, G. Schares, M.C. Venturini and L. Venturini. 2010. Toxoplasmosis and genotyping of *Toxoplasma gondii* in *Macropus rufus* and *Macropus giganteus* in Argentina. *Veterinary Parasitology* 169: 57-61.
- Murata, K. 1989. A serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in zoo animals and other Animals. *The Japanese Journal of Veterinary Science* 51: 935-940.
- Parameswaran, N., R. C. A. Thompson, N. Sundar, S. Pan, M. Johnson, N. C. Smith and M. E. Grigg. 2010. Non-archetypal Type II-like and atypical strains of *Toxoplasma gondii* infecting marsupials of Australia. *International Journal for Parasitology* 40: 635-640.
- Cedillo-Peláez, C., C. P. Rico-Torres, C. G. Salas-Garrido and D. Correa. 2011. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. *Veterinary Parasitology* 180: 368- 371.
- Pena, H. F., M. F. Marvulo, M. C. Horta, M. A. Silva, J. C. Silva, D. B. Siqueirae, P. A. Lima, S.N. Vitaliano and S. M. Gennari. 2011. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Veterinary Parasitology* 175: 377-381.
- Sakae, C. and T. Ishida. 2012. Direct evidence for *Toxoplasma gondii* infection in a wild serow (*Capricornis crispus*) from mainland Japan. *Journal of Parasitology* 98: 224-225.
- Sedlk, K. and E. Bártoová. 2006. Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Veterinary Parasitology* 136: 223-231.
- Sedlák, K., E. Bártoová, I. Literák, R. Vodicka and J. P. Dubey. 2004. Toxoplasmosis in Nilgais (*Boselaphus Tragocamelus*) and A Saiga antelope (*Saiga Tatarica*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 35: 530-533.
- Silva, J. C., S. Ogassawara, M. F. Marvulo, J. S. Ferreira-Neto and J. P. Dubey. 2001. *Toxoplasma gondii* antibodies in Exotic Wild Felids from Brazilian Zoos. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 32: 349-351.
- Su, C., X. Zhang and J. P. Dubey. 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *International Journal for Parasitology* 36: 841-848.
- Tsai, Y. J., W. C. Chung, H. H. Lei and Y. L. Wu. 2006. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in pigeons (*Columba livia*) in Taiwan. *Journal of Parasitology* 92: 871.