

分子生物学技术在检测与量化软体动物体内蠕虫感染中的应用

Molecular techniques in detection and quantification of helminthic infection in mollusc host

危芙蓉, 吕 山, 张 仪

(中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 上海 200025)

中图分类号: R388

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)10-0127-06

寄生虫病目前仍是威胁人类健康的重要传染病, 在全球疾病负担中占据不可忽视的地位, 尤其在农村和经济落后地区^[1]。尽管各种防治策略与措施已有效地降低人群感染率, 但仍面临着巨大挑战。以血吸虫病为例, 通过群体化疗, 人群感染率已得到有效控制, 但在高感染区动物中的传播并无明显降低^[2]。世界卫生组织指出研究工作应放在寄生虫病控制的新对策和方法上, 但用于评价宿主感染情况的检测方法在寄生虫病控制中仍起着重要作用。

在以软体动物为传播媒介的寄生虫病中, 淡水螺、陆生螺和蛞蝓等是常见的中间宿主。目前, 已有多种方法用于自然或人工感染中间宿主的检测和虫负荷评价。人工消化、软组织切片、尾蚴逸出等病原学检测方法, 在中间宿主的检测中应用较早, 且某些方法仍作为确诊病原的“金标准”。然而这些方法存在耗时费力, 敏感性较低等缺点。分子生物学诊断方法, 如 DNA 杂交法、免疫法、PCR 及 PCR 衍生技术等, 在一定程度上克服了其缺点^[3], 敏感性和特异性较高, 客观性更高^[4], 但也存在成本较高、对设备的要求高、难以标准化等问题。作者对各种方法的特点和优缺点进行综述如下。

1 病原学和免疫学检测方法

1.1 病原学检测方法

病原学检测方法, 如人工消化法、尾蚴逸出法、组织学方法等, 是基于显微镜的、应用最早并仍在广泛使用的检测方法。该方法直观、简单、快速且无需使用昂贵设备, 在中间宿主检测中占据重要地位。如, 检测钉螺中血吸虫(*Schistosoma* spp.) 的传统方法是将钉螺放置于两玻片之间, 挤压破壳后观察胞蚴; 或在光照条件下, 观察尾蚴逸出情况。同样, 检测椎实螺中肝片吸虫(*Fasciola hepatica*) 的方法为光照逸尾蚴或者经解剖后显微镜下检查。组织学方

法的基本原理是将组织切片后经苏木素曙红(haematoxylin-eosin, HE)染色, 在显微镜下观察。该法能定位寄生虫幼虫在组织中的寄生部位、确定其发育阶段和其在宿主中的相关生理特征。组织学方法被认为是最精确的形态学鉴定方法^[5], 其敏感性和特异性可分别达到 0.7、0.99^[6]。张超威等^[7]曾用组织学方法观察了福寿螺(*Pomacea canaliculata*) 中广州管圆线虫(*Anisostongylus cantonensis*) Ⅲ期幼虫形态特征、分布情况以及感染部位组织变化情况, 补充了广州管圆线虫幼虫发育生物学内容, 为预防广州管圆线虫病的流行提供基础资料。然而此方法耗时, 通常需要 15~30 d, 并且价格较贵。因此该方法适用于人工感染螺的检测, 而不适用于现场大规模检测。

另外, 当寄生虫处于早期感染阶段、胞蚴发育不全, 中间宿主的死亡以及形态特征相近的寄生虫等同时存在的情况下, 传统检测方法往往受到限制, 还可能会导致低估或高估中间宿主感染率。

1.2 免疫学检测方法

免疫学检测方法中, ELISA 曾被用于流行病学研究。ELISA 方法是将可溶性抗体或抗原吸附到聚苯乙烯等固相载体上, 再进行免疫酶反应, 用分光光度计比色以定性或定量, 是一种目前应用较为广泛的生物学标记技术。如通过检测曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*) 的 4 种单抗^[8]来检测双脐螺的感染

收稿日期: 2009-07-10; 修回日期: 2009-08-30

基金项目: “十一五”国家重大专项(2008ZX10004-010); 科技部国家自然科技资源基础平台项目(2005DKA21104); “十五”国家科技攻关计划项目(2003BA71ZA09-01)

作者简介: 危芙蓉(1985-), 女, 湖北武汉人, 硕士, 主要从事媒介生物学与控制研究, 电话: 13524867300, E-mail: nettle520@163.com; 张仪, 通信作者, 研究员, 硕士生导师, E-mail: zhang1972003@yahoo.com.cn

情况,双脐螺感染两周此法即能检测出阳性^[9]。ELISA 法虽具有特异性强,灵敏度高等优点,但存在交叉反应,操作较为复杂,时间相对较长,并且需要仪器检测。目前,在软体动物的寄生虫检测中应用较少。

2 分子生物学检测方法

2.1 DNA 杂交技术的运用

核酸分子杂交技术在 20 世纪 80 年代伴随着遗传学的发展而兴起。该技术的原理为根据 DNA 片段大小通过电泳分离,转移至尼龙膜上后用特异性同位素标记的探针根据碱基互补配对原则与尼龙膜上的目的 DNA 片段杂交,获得特异性条带信息。Hamburger 等^[10]运用斑点杂交法,以曼氏血吸虫全基因组作为探针检测感染性双脐螺。每只双脐螺在实验室条件下被 10 条毛蚴攻击 2 周后,只需 5 ng 阳性螺 DNA,即可检测出阳性。

随着 PCR 技术的快速发展,杂交技术与之相结合的方法开始运用于寄生虫病原体的检测。Kaplan 等^[11]克隆肝片吸虫基因组中长度为 124 bp 的高拷贝序列,并以此探针检测浮萨螺(*Fossaria cubensis*)和伪琥珀螺(*Pseudosuccinea columella*)体内肝片吸虫幼虫。曼氏血吸虫的 121 bp DNA 片段曾被用于检测双脐螺感染,但其缺点是与间插血吸虫(*S. haematobium*)发生交叉反应^[12]。

探针使用早期是用放射性同位素进行标记,而后因其对人体有害而发展了非放射性的探针标记。但运用非放射性标记后,检测的敏感性低于运用放射性同位素标记的探针。同时,还存在样本处理费时、特异性下降等问题限制了杂交技术作为一种独立的检测技术的发展。

2.2 基于 PCR 的分子生物学检测技术的运用

PCR 技术是通过体外酶促合成特异性 DNA 片段的方法。它是分子生物学技术中发展并普及最快、应用最广的新技术之一。基于 PCR 技术的分子生物学方法是通过扩增特异性 DNA 片段来检测病原体,最早运用于螺体内早期寄生虫感染性的检测^[13],目前已广泛应用于宿主体内感染性病原体的检测^[14]。Melo 等^[15]曾在血吸虫病传染地区病原鉴定中对 3 种 PCR 方法与尾蚴逸出法进行了比较,发现分子生物学方法敏感性较高。

2.2.1 传统 PCR 方法

以特异性 DNA 片段为靶基因在严格条件下进行反应的经典 PCR 方法,由于方法简便、稳定、敏感性高并且费用相对便宜而被广泛用于中间宿主体内

寄生虫的检测。

陈军虎等^[16]以日本血吸虫 18S RNA 为靶基因检测湖北钉螺(*Oncomelania hupensis*)体内日本血吸虫,其敏感性可达到 40 pg/ μ L。Hamburger 等^[15]通过扩增曼氏血吸虫的 121 bp 高拷贝片段检测双脐螺宿主体内曼氏血吸虫,双脐螺感染 1 d 后即可检测到,较上文中所用的 ELISA 方法,提前了 13 d,敏感性达到 100%。当 1 条毛蚴攻击 3 d 后的螺的 DNA 被阴性螺 DNA 稀释 100 倍后仍能检测出阳性,表明此方法用于现场大规模筛选的可行性。另外,Jan-notti-Passos 将感染的螺剔除软体组织,干燥 8 周后抽提螺壳 DNA,在低退火温度下扩增曼氏血吸虫 mtDNA,可检测出阳性,克服了病原学检测中无法对死亡宿主检测的缺陷^[17]。而螺内埃及血吸虫 PCR 检测方法^[18],经改进已用于现场监测^[19]。

野外采获椎实螺(*Lymnaea biatrix*、*L. columella*)体内肝片吸虫^[20]和大片吸虫(*Fasciola gigantica*)^[21]的 PCR 检测方法,以及 PCR 检测方法用于评价萝卜螺(*Radix labiata*、*R. balthica*)对肝片吸虫的媒介能量^[22]等等,说明此方法已被广泛用于软体动物体内蠕虫的检测中。

2.2.2 扩增片段长度多态性(AFLP)方法

AFLP 技术是 1995 年由 Vos 发展的一种检测 DNA 多态性的技术,它是结合了限制性片段长度多态性(RFLP)技术和基于 PCR 的随机扩增多态性(RAPD)技术两者优点的方法^[23]。AFLP 的原理是用两种特定的限制性内切酶酶切基因组 DNA,再将设计的特异寡核苷酸接头连接到 DNA 片段的末端,然后用带有选择性碱基、并与接头和限制性酶切位点序列互补的引物,在严格条件下对连接后的 DNA 模板进行扩增。扩增结果通过凝胶电泳,以扩增条带的不同检出多态性。AFLP 技术不需要已知基因序列特征,通过双酶切 DNA 片段,克服了 RFLP 片段相对较大而掩盖内部多态性的问题,而 PCR 反应在严格条件下完成,克服了 RAPD 重复性差的问题。但此方法存有以下缺点:首先 AFLP 分析需要同位素或非同位素标记引物,对设备和生物安全有一定要求。其次,此方法耗时较长^[14],且对 DNA 纯度和内切酶的质量要求较高,酶切不完全会影响实验结果。Hertel 等^[24]将此技术运用到光滑双脐螺体内的检测卡氏棘口吸虫(*Echinostoma caproni*)中。试验中,双脐螺被感染 1d 后即可检测出阳性,其检测的最低量达 10 fg DNA,即 50 mg 螺组织中可检测出 1 条毛蚴。

2.2.3 巢式 PCR 方法

为进一步提高检测的敏感性和特异性,经改进

的 PCR 方法——巢式 PCR 发展起来。它是使用两套引物进行两轮 PCR 扩增,先使用目的片段外侧的外引物进行第一轮扩增,然后对第一轮 PCR 产物用目的片段的内引物再进行扩增,以保证扩增片断的特异性和扩增的敏感性。Hanelt 等^[25]以曼氏血吸虫的 18s rRNA 基因为靶点,检测双脐螺的感染情况。2 条毛蚴攻击双脐螺 1 d 后即可检测出阳性。

最初的巢式 PCR 为两步法,虽然提高了敏感性,但缺点是第二步操作过程使第一步 PCR 产物容易产生污染。为克服此缺陷,将两步巢式 PCR 改进为一步反应,即两步扩增在一个试管中进行。方法改进后不仅减少污染也缩短了操作时间。在已建立的检测螺体内曼氏血吸虫的方法中,一步法巢式 PCR 敏感性是传统 PCR 方法的 100 倍,而是两步巢式 PCR 法的 1/10^[26, 27],因此需根据实验要求选择一步法或两步法巢式 PCR。

2.2.4 多重 PCR 方法

多重 PCR 是在一个反应体系中加入多对引物,同时扩增 1 份 DNA 样品中不同目的片段的 PCR 技术。在寄生虫病检测应用中,此技术实现了一步 PCR 反应中可鉴定多种寄生虫虫种或检测混合感染的样品。自 1988 年 Chamberlain 等对多重 PCR 描述后,此方法已被广泛运用到病原体检测上。Magalhães 等^[28]以肝片吸虫线粒体 DNA 中一段保守、重复性较高的序列和其中间宿主椎实螺的 ITS 区设计两对引物,检测螺中的肝片吸虫,其中针对螺的序列作为内控,排除 PCR 抑制物的作用或操作失误。此方法可检测出被 1 条毛蚴攻击的样本。此方法同时也被用于双脐螺体内曼氏血吸虫的检测^[29]。Gomez-Couso 等^[30]比较了多重 PCR 方法与免疫荧光镜检法在检测软体动物蛤、贻贝和牡蛎体内隐孢子虫(*Cryptosporidium* spp.)和贾第虫(*Giardia duodenalis*)混合感染样品中的敏感性,检测了 49 份样品,结果两种方法的阳性率分别为 56% 和 44%。多重 PCR 方法优于免疫荧光镜检法。多重 PCR 方法还被运用于福尔马林保存、石蜡和 HE 染色等样本的检测中^[31]。但此方法有时需要较多的 DNA 模板以得到扩增产物,如在帕金虫(*Perkinsus atlanticus*)的检测中^[32]。另由于多重 PCR 反应体系要求所加入的多对引物扩增条件相近,因此在优化反应条件等方面较耗时。

2.2.5 逆转录 PCR(RT-PCR)方法

RT-PCR 技术是在 mRNA 表达水平进行检测的 PCR 方法,包括两步:逆转录和 PCR 扩增,即先将利用逆转录酶将 RNA 逆转录为 cDNA,再以 cDNA 中的某个或某些片段为靶点扩增。此方法已被运用

到感染与未感染螺的基因表达差异^[33]和中间宿主体内寄生虫检测中。例如,1992 年,RT-PCR 结合 Northern 杂交技术以肝片吸虫小亚基 rDNA 为靶点检测伪琥珀螺^[34],后来经 Rognlie^[35]改进,使其敏感性达到可检测出每 5 mg 螺 RNA 中的 10 fg 寄生虫 RNA。而福寿螺体内广州管圆线虫的检测方法,敏感性达到了可检测 105 pg^[36]的虫体 RNA。但此方法易被污染,对操作要求严格,价格较贵,虽适用于表达差异的研究和实验室对软体动物的检测,但不适用于现场的大批量检测中。

2.2.6 实时定量 PCR (Real-time quantitative PCR)方法

实时定量 PCR 是新近发展起来的一种核酸微量分析技术,其原理为使用荧光标记探针或双链 DNA 特异的荧光染料,使得在 PCR 反应中产生于 PCR 产物量成正比关系的荧光信号,以实现实时分析 PCR 产物量。根据动态反应的数据,推算原始模板的含量。此方法省去 PCR 产物电泳检测的过程,整个过程可在 1 h 内完成,较其他方法省时。实时定量 PCR 已被广泛应用于临床寄生虫检测中,如疟原虫(*Plasmodium* spp.)、微小巴贝虫(*Babesia microti*),克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*),利什曼原虫(*Leishmania* spp.),刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*),和阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)^[37]等。而对于软体动物体内寄生虫检测,此方法虽还在改进中,但已用于检测牡蛎中后睾吸虫(*Ostreid herpesvirus*),其敏感性是传统 PCR 的 100 倍^[38],还用于人工感染沼螺体内麝猫后睾吸虫(*Opisthorchis viverrini*)检测^[39]、贝类中霍乱弧菌(*Vibrio vulnificus*)的检测^[40]等。此技术还可特异性扩增曼氏血吸虫 DNA^[41]检测猪感染日本血吸虫情况^[42],动物组织中刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)感染度^[43]等,说明此方法用于软体动物中寄生虫检测具有可行性。

2.2.7 其他 PCR 衍生方法

其他 PCR 衍生的方法主要是将多种检测方法结合起来,综合各方法的优点以达到提高敏感性、特异性的检测方法。如免疫 PCR 法(Immuno-polymerase chain reaction IPCR),PCR-RFLP 等。

IPCR 是由 Sano 等^[44]建立,综合 DNA 抽提、PCR 和 ELISA 的方法。IPCR 是一种抗原检测系统,将一段已知序列的 DNA 片段标记到抗原抗体复合物上,再用 PCR 方法将这段 DNA 扩增,然后用常规方法检测 PCR 产物。IPCR 集 PCR 的高灵敏度与抗体和抗原反应的特异性于一体。其突出的特点是指数级的扩增效率带来了极高的敏感度,是传统

ELISA 的 100~10 000 倍^[45]。如,将多重 PCR 与 ELISA 相结合,用于长牡蛎(*Crassostrea gigas*)中帕金虫(*P. marinus*、*P. atlanticus*)的检测。其敏感性可达到 1 ng,而传统方法为 100 pg。将 RT-PCR 与 ELISA 结合检测还可检测贝类肠道病毒等^[46],此研究暗示了用于检测软体动物寄生虫的可能性。

PCR-RFLP 是 PCR 的一种改进模式。当种间 PCR 产物长度无法通过电泳区别时,可用限制性内切酶切割 PCR 产物,然后电泳分析。例如,Kang^[47]等用此方法鉴别了与人类相关的 3 种肝吸虫。同理,此方法将可尝试用于软体动物的检查中。

3 结语

一种好的检测方法应具有以下特点:(1) 特异性达到能分清物种,即种群水平;(2) 简单、快速和有效;(3) 对样本的收集和储存要求较低^[48]。病原学检测方法,简单直观,但耗时费力,敏感性和特异性较低,尤其对于形态相近的寄生虫,难以区别。分子生物学方法在敏感性和特异性上优于病原学方法,但同时存在缺点。首先,PCR 检测所需用于抽提 DNA 的样本量少,但由于寄生虫一般有组织倾向性或者分布不均的特点,尤其在感染度较低时,可能由于取样时未取到感染部位而出现假阴性的情况。其次,DNA 抽提方法是阻碍 PCR 方法用于现场检测的一个方面。软体动物多被外界生物(如病毒、细菌、原生动物等)感染,环境中的有机、无机物质可导致假阳性,而软体动物富含脂类、多糖、蛋白质等,这些物质为 PCR 反应的抑制物,可导致假阴性结果^[49]。最后,PCR 反应体系的优化过程较复杂。目前,由于 PCR 方法的不断优化,人们的注意力逐渐转向此方法,但仍不可忽视传统病原学检测方法。在分子检测为阳性的情况下,仍需要通过查到病原体而确证,而不是完全由分子生物学方法所替代。两类方法应相互补充,发挥各自优势,使检测的敏感性和特异性更好。

由于分子生物学方法缺乏样品取样及实验操作的标准化,加上这些新方法较传统方法价格昂贵,使得这些技术大多数局限在实验室水平,而难以在现场被广泛应用,因此发展高敏感性和特异性、操作性强、低成本和标准化的分子生物学检测方法将是今后的发展方向。

参考文献:

[1] Hotez P J, Molyneux D H, Fenwick A, *et al.* Control of neglected tropical diseases [J]. **N Engl J Med**, 2007, **357**(10): 1 018-1 027.

[2] King C H, Sturrock R F, Kariuki H C, *et al.* Transmission control for schistosomiasis-why it matters now [J]. **Trends Parasitol**, 2006, **22**(12): 575-582.

[3] Walker P, Subasinghe R. DNA-based molecular diagnostic techniques: Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases [J]. **Fisheries technical paper (FAO)**, 2000.

[4] Qvarnstrom Y, Sullivan J J, Bishop H S, *et al.* PCR-based detection of *Angiostrongylus cantonensis* in tissue and mucus secretions from molluscan hosts [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2007, **73**(5): 1 415-1 419.

[5] Caron Y, Rondelaud D, Losson B. The detection and quantification of a digenean infection in the snail host with special emphasis on *Fasciola* sp. [J]. **Parasitol Res**, 2008, **103**(4): 735-744.

[6] Renault T. Genomics and mollusc pathogens: trends and perspective [J]. **JVCS**, 2008, **1**(2): 5-14.

[7] 张超威,周晓农,吕山,等.福寿螺体内广州管圆线虫 III 期幼虫的形态学观察 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2008, **26**(3): 203, 209.

[8] Hamburger J, Weil M, Anton M, *et al.* *Schistosoma mansoni* antigens recognized in *Biomphalaria glabrata* hemolymph by monoclonal antibodies [J]. **Am J Trop Med Hyg**, 1989, **40**(6): 605-612.

[9] Hamburger J, Weil M, Turetzky T, *et al.* Identification of snails infected with schistosomes by Elisa employing monoclonal antibodies: *Schistosoma mansoni* in laboratory snails (*Biomphalaria glabrata*) and in Field Snails (*Biomphalaria pfeifferi*) from Kenya [J]. **Am J Trop Med Hyg**, 1989, **40**(6): 613.

[10] Hamburger J, Weil M, Pollack Y. Detection of *Schistosoma mansoni* DNA in extracts of whole individual snails by dot hybridization [J]. **Parasitol Res**, 1987, **1987**(74): 97-100.

[11] Kaplan R M, Dame J B, Reddy G R, *et al.* A repetitive DNA probe for the sensitive detection of *Fasciola hepatica* infected snails [J]. **Int J Parasitol**, 1995, **25**(5): 601-610.

[12] Hamburger J, Turetski T, Kapeller I, *et al.* Highly repeated Short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a Species-Specific Probe [J]. **Mol Biochem Parasitol**, 1991, **44**(1): 73-80.

[13] Abath F G C, Gomes ALDV, Melo F L, *et al.* Molecular approaches for the detection of *Schistosoma mansoni*: Possible applications in the detection of snail infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection [J]. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2006, **101**(suppl. 1): 145-148.

[14] Gasser R B. Molecular tools—advances, opportunities

- and prospects [J]. **Vet Parasitol**, 2006, **136** (2): 69-89.
- [15] Hamburger J, He N, Xu YX, *et al.* A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with *Bilharzia* parasites (*Schistosoma mansoni*) from very early prepatency [J]. **Am J Trop Med Hyg**, 1998, **59** (6): 872-876.
- [16] 陈军虎, 闻礼永, 张旭照, 等. 检测日本血吸虫感染性钉螺 PCR 方法的建立 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, **24**(3): 204-207.
- [17] Caldeira R L, Jannotti-Passos L K, Lira P M, *et al.* Diagnostic of *Biomphalaria* snails and *Schistosoma mansoni*: DNA obtained from traces of shell organic materials [J]. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2004, **99**(5): 499-502.
- [18] Hamburger J, He N, Abbasi I, *et al.* Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence of *Schistosoma haematobium*: A potential tool for monitoring schistosome-infested water [J]. **Am J Trop Med Hyg**, 2001, **65**(6): 907-911.
- [19] Hamburger J, Hoffman O, Kariuki H C, *et al.* Large-scale, polymerase chain reaction-based surveillance of *Schistosoma haematobium* DNA in snails from transmission sites in coastal Kenya: A new tool for studying the dynamics of snail infection [J]. **Am J Trop Med Hyg**, 2004, **71**(6): 765-773.
- [20] Cucher M A, Carnevale S, Prepelitchi L, *et al.* PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails [J]. **Vet Parasitol**, 2006, **137**(1-2): 74-82.
- [21] Velusamy R, Singh B P, Raina O K. Detection of *Fasciola gigantica* infection in snails by polymerase chain reaction [J]. **Vet Parasitol**, 2004, **120**(1-2): 85-90.
- [22] Caron Y, Lasri S, Losson B. *Fasciola hepatica*: An assessment on the vectorial capacity of *Radix labiata* and *R. balthica* commonly found in Belgium [J]. **Vet Parasitol**, 2007, **149**(1-2): 95-103.
- [23] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. **Nucleic Acids Res**, 1995, **23**(21): 4 407-4 414.
- [24] Hertel J, Haberl B, Hamburger J, *et al.* Description of a tandem repeated DNA sequence of *Echinostoma caproni* and methods for its detection in snail and plankton samples [J]. **Parasitology**, 2003, **126**(Pt 5): 443-449.
- [25] Hanelt B, Adema C M, H. Mansour M, *et al.* Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* Using Nested PCR [J]. **J Parasitol**, 1997, **83**(3): 387-394.
- [26] Melo F L, Gomes ALdV, Barbosa C S, *et al.* Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis [J]. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 2006, **100**(11): 1 049-1 055.
- [27] Mendes C L, Abath F G C, Leal N C. Development of a multiplex single-tube nested PCR (MSTNPCR) assay for *Vibrio cholerae* O1 detection [J]. **J Microbiol Methods**, 2008, **72**(2): 191-196.
- [28] Magalhães K G, Jannotti Passos L K, Dos Santos Carvalho O. Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through multiplex-PCR [J]. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2004, **99**(4): 421-424.
- [29] Jannotti-passos L, Vidigal T, Dias-neto E, *et al.* PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails [J]. **J Parasitol**, 1997, **83** (3): 395-399.
- [30] Gómez-Couso H, Freire-Santos F, Amar CFL, *et al.* Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR [J]. **Int J Food Microbiol**, 2004, **91**(3): 279-288.
- [31] Kelly Grace M, Jannotti-Passos L K. Isolation and detection of *Fasciola hepatica* DNA in *Lymnaea viatrix* from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues through multiplex-PCR [J]. **Vet Parasitol**, 2008, **152** (3-4): 333-338.
- [32] Elandalloussi LM, Leite RM, Afonso R, *et al.* Development of a PCR-ELISA assay for diagnosis of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus atlanticus* infections in bivalve molluscs [J]. **Mol Cell Probes**, 2004, **18** (2): 89-96.
- [33] Lockyer AE, Noble LR, Rollinson D, *et al.* *Schistosoma mansoni*: resistant specific infection-induced gene expression in *Biomphalaria glabrata* identified by fluorescent—based differential display [J]. **Exp Parasitol**, 2004, **107**(1-2): 97-104.
- [34] Shubkin C, White M, Abrahamsen M, *et al.* A nucleic acid-based test for detection of *Fasciola hepatica* [J]. **J Parasitol**, 1992, **78**(5): 817-821.
- [35] Rognlie M, Dimke K, Knapp S. Detection of *Fasciola hepatica* in infected intermediate hosts using RT-PCR [J]. **J Parasitol**, 1994, **80**(5): 748-755.
- [36] 张仪, 周晓农, 刘和香, 等. PCR 检测大瓶螺体内广州管圆线虫幼虫方法的建立 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, **24**(5): 353-355.
- [37] Espy M J, Uhl J R. Real-Time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing [J]. **Am Soc Microbiol**, 2006, **19**(1): 165-256.
- [38] Pepin J F, Riou A, Renault T. Rapid and sensitive detection of *Ostreid herpesvirus 1* in oyster samples by Real-Time PCR [J]. **J Virol Methods**, 2008, **149**(2): 269-276.
- [39] Intapan P M, Thanchomnang T, Lulitanond V, *et al.* Detection of *Opisthorchis viverrini* in infected bithynid

- snails by Real-Time fluorescence resonance energy transfer PCR-based method and melting curve analysis [J]. *Parasitol Res*, 2008, **103**(3): 649-655.
- [40] Panicker G, Myers M, Bej A. Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and gulf of Mexico Water by Real-Time PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(1): 498-507.
- [41] Gomes ALDV, Melo FL, Werkhauser RP, *et al.* Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of *Schistosoma mansoni* DNA [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2006, **101**(Suppl. 1): 133-136.
- [42] Lier T, Johansen MV, Hjelmevoll SO, *et al.* Real-time PCR for detection of low intensity *Schistosoma japonicum* infections in a pig model [J]. *Acta Trop*, 2008, **105**(1): 74-80.
- [43] Jauregui L, Higgins J, Zarlenga D, *et al.* Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Toxoplasma gondii* in Pig and Mouse Tissues [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, **39**(6): 2 065-2 071.
- [44] Sano T, Smith C, Cantor C. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates [J]. *Science*, 1992, **258**(5079): 120-122.
- [45] Niemeyer C M, Adler M, Wacker R. Immuno-PCR: High sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification [J]. *Trends Biotechnol*, 2005, **23**(4): 208-216.
- [46] Milne S A, Gallagher S, Cash P, *et al.* A sensitive and reliable reverse transcriptase PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human pathogenic viruses in bivalve molluscs [J]. *J Food Prot*, 2007, **70**(6): 1 475-1 482.
- [47] Kang S, Sultana T, Loktev V B, *et al.* Molecular identification and phylogenetic analysis of nuclear rDNA sequences among three opisthorchid liver fluke species (Opisthorchiidae: Trematoda) [J]. *Parasitol Int*, 2008, **57**(2): 191-197.
- [48] Kozak-Cieszczyk M, Wedrychowicz H. The application of molecular techniques in environmental monitoring of helminth parasites [J]. *Acta Parasitol*, 2003, **48**(2): 73-82.
- [49] Wilson I G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(10): 3 741-3 751.

(本文编辑:张培新)