

重组酶介导的隐孢子虫属特异性等温核酸扩增方法的建立及评价

倪碧娴^{1,2}, 吴小珉^{1,2}, 刘燕红³, 徐祥珍^{1,2}, 应清界³, 曹俊^{1,2}, 戴洋^{1,2*}

[摘要] **目的** 建立一种可用于隐孢子虫检测的重组酶介导的等温核酸扩增(RAA)方法,并对其检测敏感性和特异性进行评价。**方法** 以隐孢子虫属特异性 18S rRNA 核酸序列作为检测靶标,采用 Amplifx 软件设计、合成引物及荧光检测探针,构建并优化 RAA 荧光反应体系;分别以不同拷贝数的含 18S rRNA 靶序列的重组质粒、不同浓度隐孢子虫卵囊基因组 DNA 及不同数量隐孢子虫卵囊基因组 DNA 为模板进行 RAA 荧光法检测,以评价其敏感性;分别以隐孢子虫卵囊、蓝氏贾第鞭毛虫包囊、日本血吸虫虫卵、似蚓蛔线虫虫卵、华支睾吸虫虫卵、沙门氏菌、志贺氏菌基因组 DNA 为模板进行 RAA 荧光法检测,以评价其特异性。**结果** 成功建立了隐孢子虫检测 RAA 法,该方法可在 39 °C、20 min 内得到隐孢子虫属 18S rRNA 基因片段的有效扩增。以不同拷贝数的含 18S rRNA 靶序列的重组质粒、不同浓度隐孢子虫卵囊基因组 DNA 及不同数量隐孢子虫卵囊基因组 DNA 为模板,该方法最低检出限分别为 10² 拷贝/μL、1 pg/μL 和 1 个/50 μL;以蓝氏贾第鞭毛虫包囊、日本血吸虫虫卵、似蚓蛔线虫虫卵、华支睾吸虫虫卵、沙门氏菌、志贺氏菌基因组 DNA 为模板的荧光 RAA 扩增结果均为阴性。**结论** 成功建立了一种可用于检测隐孢子虫卵囊 DNA 的 RAA 法,该方法操作简便、反应快速,敏感性和特异性均较好。

[关键词] 隐孢子虫;核酸检测;重组酶介导的等温扩增法;荧光探针;检测效能

[中图分类号] R382.3 **[文献标识码]** A

Establishment and evaluation of the detection method of *Cryptosporidium* specific DNA fragment by recombinase aided isothermal amplification

NI Bi-Xian^{1,2}, WU Xiao-Min^{1,2}, LIU Yan-Hong³, XU Xiang-Zhen^{1,2}, YING Qing-Jie³, CAO Jun^{1,2}, DAI Yang^{1,2*}

1 National Health Commission Key Laboratory of Parasitic Disease Control and Prevention, Jiangsu Provincial Key Laboratory on Parasite and Vector Control Technology, Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China; 2 Public Health Research Center, Jiangnan University, China; 3 Jiangsu Qitian Gene Technology Co., Ltd, China

* Corresponding author

[Abstract] **Objective** To establish a recombinase-aided isothermal amplification (RAA) assay for detection of *Cryptosporidium*. **Methods** Based on *Cryptosporidium*-specific 18S rRNA selected as the target gene to be detected, and the primer sequences and fluorescent probes designed using the software Amplifx, and a fluorescent RAA assay was established and optimized. The fluorescent RAA assay was performed to detect 18S RNA target sequence-contained recombinant plasmids at various copies, genomic DNA of *Cryptosporidium* oocysts at various concentrations, and genomic DNA extracted from various numbers of *Cryptosporidium* oocysts to assess the sensitivity of the assay, and to detect genomic DNA extracted from *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia lamblia* cysts, *Schistosoma japonicum* eggs, *Ascaris lumbricoides* eggs, *Clonorchis sinensis* eggs, *Salmonella* and *Shigella* to determine the specificity of the assay. **Results** A fluorescent RAA assay was successfully established, which was effective to amplify the specific 18S RNA gene fragments of *Cryptosporidium* within 20 min at 39 °C. The lowest limits of the fluorescent RAA assay were 102 copies/μL for detection of 18S RNA target sequence-contained recombinant plasmids at various copies, 1 pg/μL for detection of genomic DNA of *Cryptosporidium* oocysts at various concentrations, and one *Cryptosporidium* oocyst/μL for detection of genomic DNA ex-

[基金项目] 江苏省“科教强卫工程”项目(ZDXKA2016016)、省属公益类科研院所自主科研项目(BM2018020)、江苏省青年医学人才项目(QN-RC2016622)、江南大学公共卫生研究中心青年项目(JUPH201832)

[作者单位] 1 国家卫生健康委员会寄生虫病预防与控制技术重点实验室、江苏省寄生虫与媒介控制技术重点实验室、江苏省血吸虫病防治研究所(无锡214064); 2 江南大学公共卫生研究中心; 3 江苏省奇天生物科技有限公司

[作者简介] 倪碧娴,女,硕士,医师。研究方向:寄生虫病防治

* 通信作者 E-mail: 15951581011@163.com

[数字出版日期] 2019-09-19 10:12:09

[数字出版网址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1374.R.20190918.1103.001.html>

tracted from various numbers of *Cryptosporidium* oocysts, and the fluorescent RAA assay was all negative for detection of genomic DNA from *G. lamblia* cysts, *S. japonicum* eggs, *A. lumbricoides* eggs, *C. sinensis* eggs, *Salmonella* and *Shigella*. **Conclusion** A novel fluorescent RAA assay is successfully established, which is simple, rapid, sensitive and specific to detect genomic DNA of *Cryptosporidium* oocysts.

[Key words] *Cryptosporidium*; Nucleic acid detection; Recombinase-aided isothermal amplification assay; Fluorescent probe; Diagnostic efficiency

隐孢子虫(*Cryptosporidium* spp.)是一类常见的寄生于人和动物体内的顶复门寄生原虫,人体可通过食入被隐孢子虫卵囊污染的水源、食物及与动物密切接触等多种途径而感染致病,患者常表现出腹泻等胃肠道症状;免疫功能低下者感染后可引起长期、迁延难愈的腹泻^[1]。隐孢子虫病呈世界性分布,迄今已有90多个国家、至少300个地区有病例报道,各地感染率高低不一^[2]。在腹泻患者中,发达国家隐孢子虫检出率为1%~3%,发展中国家检出率为5%~10%^[3-7]。我国于1987年在南京市首次发现人体感染隐孢子虫病例^[8],其后重庆、安徽、内蒙、福建、山东和湖南等地区先后有病例报道,腹泻患者隐孢子虫感染率为0.3%~16.1%^[9]。

目前,隐孢子虫检测主要采用病原学、免疫学及分子生物学方法。病原学检测方法是隐孢子虫感染诊断的“金标准”,采用粪便直接涂片法或特殊染色法(改良抗酸染色等)于显微镜下检测隐孢子虫卵囊,具有费时、费力、敏感性及特异性均不高等缺点。基于PCR的分子生物学检测技术具有灵敏度高、特异性好等优势,但对人员及设备要求高,检测时间长达1.5~2 h。此外,我国居民生活饮用水中隐孢子虫卵囊检测方法为免疫磁分离荧光抗体法^[10],该方法包括过滤、洗脱、浓缩、分离纯化、荧光显色和镜检等多个步骤,具有操作复杂、对操作人员要求高、镜检时易漏检产生假阴性结果及检测周期长等不足,且检测成本较高,限制了其大规模推广应用。因此,开发简便、快速的隐孢子虫核酸检测技术是目前的重要研究方向。

重组酶介导等温核酸扩增(Recombinase-aided isothermal amplification, RAA)可在等温条件下(一般为37~42℃),5~20 min内实现对目的基因片段的扩增,具有操作简便、快速扩增及可对结果进行实时监测等优势。目前该检测技术已成功应用于病原体检测、疾病诊断等多个领域,均显示出较高的敏感性 & 特异性^[11-13]。

本研究拟针对隐孢子虫属特异性核酸序列建立基于RAA的检测方法,并对其检测敏感性 & 特异性进行评价,从而为隐孢子虫现场检测提供一种适宜的

新方法。

材料与方法

1 材料

1.1 样本来源 微小隐孢子虫虫株由河南农业大学张龙现教授惠赠。蓝氏贾第鞭毛虫包囊、日本血吸虫虫卵、似蚓蛔线虫虫卵、华支睾吸虫虫卵均由国家卫生健康委员会寄生虫病预防与控制技术重点实验室提供。沙门氏菌、志贺氏菌由江苏省奇天基因生物科技有限公司实验室提供。

1.2 主要仪器设备 恒温水槽(QT-ZJ-084)、离心机(Eppendorf公司)、-80℃超低温冰箱(海尔公司)、NanoDrop2000核酸蛋白浓度测定仪(ThermoFisher公司)、QT-YF-012涡旋震荡仪、RAA-F1620荧光基因检测仪(江苏奇天基因生物科技有限公司)。

1.3 主要试剂 组织DNA提取试剂盒(江苏奇天基因生物科技有限公司)、QIAamp PowerFecal DNA提取试剂盒(Qiagen公司)、RAA基础反应单元及RAA荧光基础反应单元(江苏奇天基因生物科技有限公司)、质粒抽提试剂盒(Promega公司);50×TAE缓冲液、琼脂糖、溴化乙锭(EB)均购自北京索莱宝科技有限公司。

2 方法

2.1 核酸提取 隐孢子虫卵囊、蓝氏贾第鞭毛虫包囊、沙门氏菌及志贺氏菌基因组DNA采用组织样本DNA提取试剂盒进行提取,操作步骤按试剂盒说明书进行;日本血吸虫虫卵、似蚓蛔线虫虫卵、华支睾吸虫虫卵基因组DNA采用QIAamp PowerFecal DNA提取试剂盒提取,具体操作步骤按试剂盒说明书进行。提取的基因组DNA样本测定浓度后,-80℃保存备用。

2.2 RAA方法的建立

2.2.1 特异性核酸序列筛选及引物设计 选择隐孢子虫属特异性的18S rRNA作为RAA检测的靶基因,在Genbank中找到相应的全基因序列,运用DNAMAN 7.0软件进行同源性分析,筛选出高度保守的核酸序列作为RAA检测靶标。根据RAA原理,应用

Amplifx 软件设计特异性扩增靶序列的上、下游引物及探针。上游引物: 5'-CWATGACGGGTAAC-GGGGAATTAGGGTTCG-3'; 下游引物: 5'-CTC-CAATTGATACTYGTWAAGGGGTTTATAC-3'; 荧光探针: 5'-CGCAAATTACCCAATCCTRAYACAGGGAGG(FAM-dT)A(THF)(BHQ1-dT)GACAAGAAATAACAAT-3'(其中FAM为荧光报告基团, THF为四氢呋喃残基, BHQ1为荧光淬灭基团)。引物、探针及质粒均委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。

2.2.2 RAA基础反应体系的建立 基础反应体系包含: Tris缓冲液、醋酸镁、醋酸钾、聚乙二醇、二硫苏糖醇、磷酸肌酸、ATP、dNTPs、单链结合蛋白、重组酶、UvsY蛋白、DNA聚合酶、上下游引物、隐孢子虫基因组, 总反应体系为50 μ L。将以上反应体系混匀, 置于水浴箱或QT-RAA-B6100震荡混匀仪中, 39 $^{\circ}$ C条件下反应30 min。反应结束后, 将反应管取出, 扩增产物中加入1:1酚/氯仿50 μ L, 振荡混匀, 12 000 $\times g$ 离心1 min。吸取10 μ L上层溶液进行琼脂糖凝胶电泳(凝胶浓度为1%, 100 V)60 min, EB染色后, 置于紫外灯下观察条带。

2.2.3 荧光RAA反应体系的建立 按RAA荧光检测试剂盒说明书配制反应体系。反应体系为50 μ L, 其中包括25 μ L反应缓冲液、12.7 μ L双蒸水、2.1 μ L上游引物(420 nmol/L)、2.1 μ L下游引物(420 nmol/L)、0.6 μ L探针(120 nmol/L), 混匀后加至RAA反应单元冻干粉中, 将复溶的反应单元手弹混匀, 瞬时离心。向反应单元管盖中加入2.5 μ L醋酸镁溶液(280 nmol/L), 然后加入5 μ L隐孢子虫基因组于反应单元中。将以上反应体系置于QT-RAA-B6100震荡混匀仪中震荡混匀, 结束后置于QT-RAA-F1620荧光检测仪中39 $^{\circ}$ C反应20 min, 每20 s采集1次荧光值。实验结束后, 根据QT-RAA-F1620荧光检测仪的阳性判定方法, 斜率值 $K \geq 20$ 时判为阳性, 斜率值 $K < 20$ 时判为阴性。

2.3 荧光RAA法敏感性评价

2.3.1 以隐孢子虫18S rRNA靶序列重组质粒为模板 以隐孢子虫18S rRNA核酸序列作为检测靶标构建入TA克隆质粒载体, 将5 μ L阳性重组质粒转化入大肠杆菌(DH5 α)培养, 试剂盒抽提重组质粒, 调整初始浓度至 10^0 拷贝/ μ L, 进一步制成不同浓度梯度的工作标准品, 即分别含有 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、10拷贝/ μ L隐孢子虫的靶标DNA, 以此为模板分别进行RAA扩增, 检测荧光信号。

2.3.2 以不同浓度隐孢子虫卵囊基因组DNA为模

板 将初始浓度为6 ng/ μ L的隐孢子虫卵囊基因组DNA稀释至1 ng/ μ L, 然后进行梯度稀释, 得到浓度分别为1、0.1、0.01、0.001 ng/ μ L的隐孢子虫卵囊基因组DNA样本, 各取5 μ L模板DNA进行RAA扩增, 检测荧光信号。

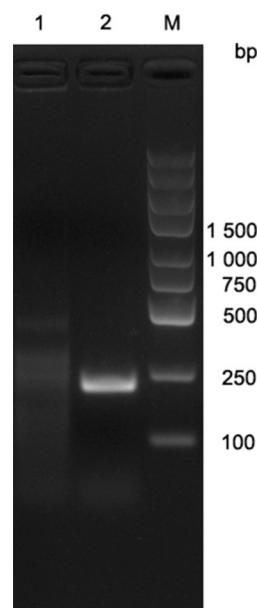
2.3.3 以不同数量隐孢子虫卵囊基因组DNA为模板 将隐孢子虫卵囊制成不同浓度梯度的PBS工作液, 分别含有1、2、4、8、15、30、60、125、250、500个卵囊/50 μ L, 采用试剂盒分别提取不同浓度PBS工作液中隐孢子虫卵囊基因组DNA, 并以此为模板分别进行RAA扩增, 检测荧光信号。

2.4 荧光RAA法特异性评价 分别以隐孢子虫卵囊、蓝氏贾第鞭毛虫包囊及日本血吸虫虫卵、似蚓蛔线虫虫卵、华支睾吸虫虫卵、沙门氏菌、志贺氏菌基因组DNA为模板, 进行荧光RAA扩增, 检测荧光信号。

结 果

1 以隐孢子虫卵囊基因组DNA为模板的基础RAA反应结果

以隐孢子虫卵囊基因组DNA为模板进行基础RAA反应, 产物经1%琼脂糖凝胶电泳后EB染色, 在紫外灯下可见明显的目的条带, 大小约为197 bp(图1)。



注: 1 阴性对照; 2 隐孢子虫卵囊基因组DNA; M DNA分子质量标志物

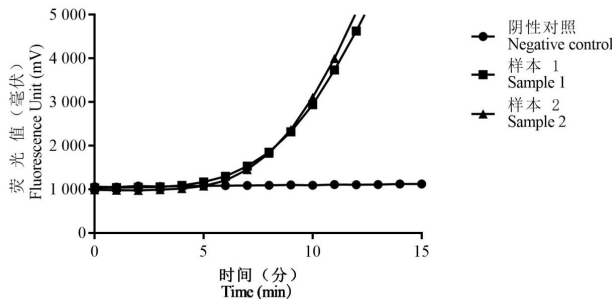
Note: 1 Negative control; 2 Genomic DNA of *Cryptosporidium* oocysts; M DNA molecular markers

图1 隐孢子虫卵囊基因组RAA琼脂糖电泳结果

Fig. 1 Result of agarose electrophoresis using genomic DNA of *Cryptosporidium* oocyst as templates

2 以隐孢子虫卵囊基因组DNA为模板的荧光RAA反应结果

分别以2份隐孢子虫卵囊基因组DNA样本为模板进行荧光RAA法扩增,同时设立阴性对照,反应温度39℃,反应时间15 min。结果显示,2份样本在10 min内即出现明显扩增,结果判定为阳性,阴性对照无扩增(图2)。



注:样本1、2均为隐孢子虫卵囊基因组DNA

Note: Samples 1 and 2 are both genomic DNA of *Cryptosporidium* oocysts

图2 以隐孢子虫卵囊基因组DNA为模板的
荧光RAA扩增结果

Fig. 2 Result of fluorescent RAA amplification using *Cryptosporidium* oocysts genomic DNA as templates

3 荧光RAA法检测敏感性

3.1 以隐孢子虫18S rRNA靶序列重组质粒为模板

随着拷贝数的降低,RAA法扩增起峰时间逐渐延长,且10 min内所有样品均出现明显扩增,最低能检测到含 1.0×10^2 拷贝/ μL 重组质粒的荧光信号,灵敏度达到 10^2 拷贝/ μL (图3)。

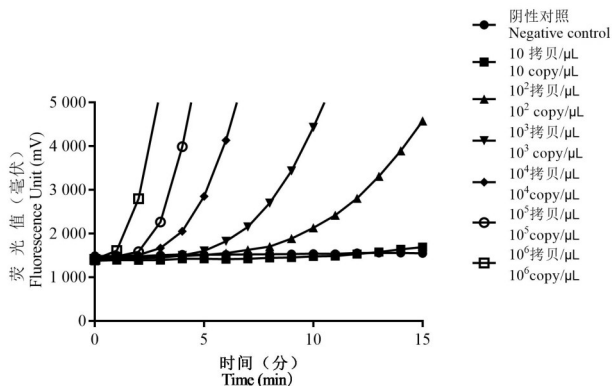


图3 以不同拷贝数重组质粒为模板的
荧光RAA法检测结果

Fig. 3 Sensitivity of fluorescent RAA method by using gradient dilutions of recombinant plasmid as templates

3.2 以不同浓度隐孢子虫卵囊DNA为模板 除阴性

对照无扩增外,其余浓度分别为1、0.5、0.1、0.01、0.001 ng/ μL 的隐孢子虫卵囊样本均出现明显扩增,其检测敏感性为1 pg/ μL (图4)。

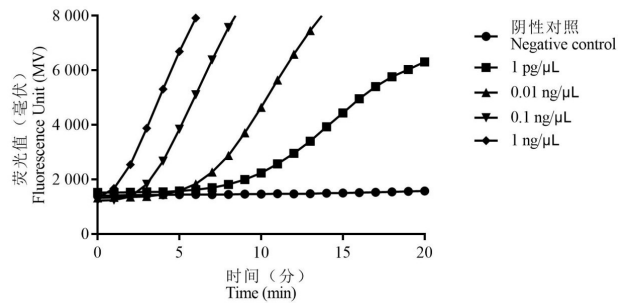


图4 以不同浓度隐孢子虫卵囊DNA为模板的
荧光RAA法检测结果

Fig. 4 Sensitivity of fluorescent RAA method with different concentration of *Cryptosporidium* oocysts genomic DNA as templates

3.3 以不同数量隐孢子虫卵囊DNA为模板 除阴性对照无扩增外,其余浓度分别为1、2、4、8、15、30、60、125、250、500个/50 μL 的隐孢子虫卵囊样本均出现明显扩增,其检测敏感性为1个卵囊/50 μL (图5)。

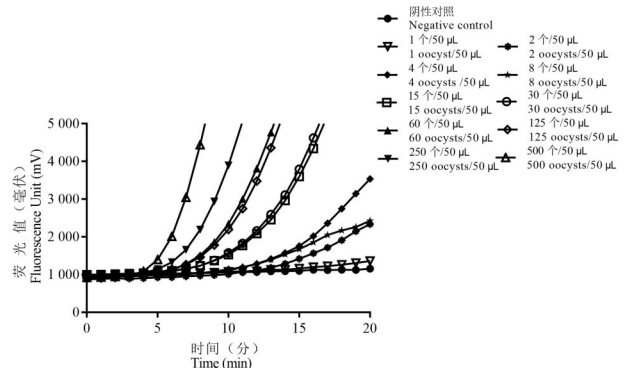


图5 以不同数量隐孢子虫卵囊DNA为模板的
荧光RAA法检测结果

Fig. 5 Sensitivity of fluorescent RAA method with different numbers of *Cryptosporidium* oocysts genomic DNA as templates

4 荧光RAA法检测特异性

分别以隐孢子虫卵囊、蓝氏贾第鞭毛虫包囊及日本血吸虫虫卵、似蚓蛔线虫虫卵、华支睾吸虫虫卵、沙门氏菌、志贺氏菌基因组DNA为模板进行RAA扩增。结果显示,仅隐孢子虫卵囊核酸在10 min内明显扩增,判定为阳性;蓝氏贾第鞭毛虫包囊、日本血吸虫虫卵、似蚓蛔线虫虫卵、华支睾吸虫虫卵、沙门氏菌、志贺氏菌均未扩增,判定为阴性(图6)。

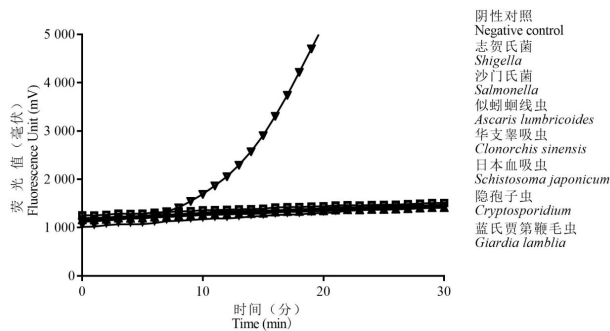


图6 不同病原体基因组DNA为模板的荧光
RAA法检测结果

Fig. 6 Specificity of fluorescent RAA method with
genomic DNA of different pathogens

讨 论

目前,分子生物学检测方法中研究较多的等温核酸扩增方法包括环介导等温扩增技术(LAMP)及重组酶聚合酶扩增(RPA),LAMP技术已用于大肠杆菌、沙门氏菌、李斯特氏菌和副溶血性弧菌等细菌检测^[14-15],但该方法不易区分非特异性扩增,且引物设计复杂、对操作环境及人员要求较高。RPA技术利用T4重组酶活性,在37~42℃即能实现DNA解链并在15~30 min内完成目的片段的快速扩增,但该方法完全依赖进口,货源不稳定且价格昂贵,从而限制了其推广应用^[16]。

本研究中采用的RAA法是利用重组酶介导在等温条件下进行核酸快速扩增的技术,使用的重组酶从细菌或真菌中获取,引物设计简单,且完全实现了国产化,等温条件下(37~42℃)在极短时间内(通常5~20 min)即可完成整个扩增反应,尤其适合在现场进行快速检测。同时本研究还设计了特异荧光检测探针,成功建立了荧光RAA检测方法,可实时观察、获取检测结果,且具有较高的检测敏感性和特异性。

近年来,研究发现可感染人类的隐孢子虫种多达38种,其中引起人体腹泻的以人隐孢子虫(*C. hominis*)和微小隐孢子虫(*C. parvum*)多见^[17]。隐孢子虫18S rRNA核酸序列因在隐孢子虫进化过程中具有高度保守性,常被选为核酸检测和分子分型的检测靶标,几乎能鉴别所有隐孢子虫种类,是目前应用最广的基因位点之一。本研究中检测靶序列来自18S rRNA基因序列保守区,具有高度的隐孢子虫属特异性。鉴于目前仅能获取微小隐孢子虫虫株,故本研究仅采用微小隐孢子虫进行RAA方法的验证及评价,

后续研究中将进一步增加该方法用于其他隐孢子虫虫种检测的评价。

在隐孢子虫检测方面,史亚东等^[18]建立的LAMP快速检测法的反应温度和时间分别为63℃和60 min,检测限为5个卵囊/μL;吴耀东^[19]建立的LF-RPA检测方法在30~45℃条件下10 min最低可检测到0.5个卵囊/50 μL。本研究建立的隐孢子虫荧光RAA法以重组质粒为模板,最低可检出的质粒浓度为10²拷贝/μL;以不同数量隐孢子虫卵囊为模板,最低可检出的卵囊数为1个卵囊/50 μL;以不同浓度卵囊基因组为模板,最低可检出的浓度为1 pg/μL,其灵敏度高于Bakheit等^[20]采用的LAMP法(10 pg/μL)。此外,RAA法可在39℃进行,不依赖于复杂的温度控制设备,20 min内即可得到有效扩增,操作快速简便,因此具有现场应用优势。由于虫体样本来源问题,本研究仅选择了蓝氏贾第鞭毛虫包裹、日本血吸虫虫卵、似蚓蛔线虫虫卵、华支睾吸虫虫卵、沙门氏菌、志贺氏菌等病原体进行比较,结果显示该方法具有较好的检测特异性。隐孢子虫属于原虫孢子虫纲,如能增加溶组织内阿米巴、环孢子虫、芽囊原虫等肠道原虫的检测结果并进行比较,则能更客观全面地评价该方法检测隐孢子虫的特异性。

综上所述,本研究首次建立了一种针对隐孢子虫属特异性18S rRNA核酸序列的RAA检测方法,该方法具有操作简便、快速、敏感性高及特异性好等特点,适合在现场使用。后续的研究工作中,本项目组将进一步开展针对多种虫体样本的敏感性及其特异性评价,同时开展荧光RAA法用于粪便及水体样本中隐孢子虫检测的应用研究,从而为该方法的推广应用进一步奠定基础。

[参考文献]

- [1] 李雍龙. 人体寄生虫学[M]. 8版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 46-74.
- [2] Checkley W, White J, Jaganath DA, et al. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*[J]. Lancet Infect Dis, 2015, 15(1): 85-94.
- [3] Ajampur SS, Liakath FB, Kannan A, et al. Multisite study of cryptosporidiosis in children with diarrhea in India[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(6): 2075-2081.
- [4] Kosek M, Alcantara C, Lima AA, et al. Cryptosporidiosis: an update[J]. Lancet Infect Dis, 2001, 1(4): 262-269.
- [5] Casemore DP. Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis[J]. Epidemiol Infect, 1990, 104: 1-28.
- [6] Goh S, Reacher M, Casemore DP, et al. Sporadic cryptosporidiosis, North Cumbria, England, 1996-2000[J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10(6): 1007-1015.

(下转第399页)

- (1): 21-23.
- [2] 冯建军. 统计地图的分级表示法[J]. 大地纵横, 1996, 3(1): 45-46.
- [3] 裘炯良, 郑剑宁, 周健, 等. 趋势面分析法在传染病地理分布研究中的应用[J]. 中国热带医学, 2004, 4(5): 689-691, 702.
- [4] 齐鑫山, 王晓明, 张玉芳. 环境监测数据空间分布规律的研究方法及应用—趋势面分析法[J]. 环境保护, 2000, 28(10): 20-22.
- [5] 姜庆五, 赵飞. 空间自相关分析方法在流行病学中的应用[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(6): 539-546.
- [6] 丁磊, 张萌, 赵仲堂. 空间分析在自然疫源性疾病流行病学研究中的应用[J]. 中华疾病控制杂志, 2012, 16(10): 897-901.
- [7] 杨文. 四川藏区包虫病流行现状与防治对策[C]//全国人畜共患病学术研讨会论文集, 北京, 2006: 26-28.
- [8] 王国强, 于竞进, 王宇, 等. 全国包虫病流行情况调查报告[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2016: 96.
- [9] Miteřáková M, Hurníková Z, Antolová D, et al. Endoparasites of red Fox (*Vulpes vulpes*) in the Slovak Republic with the emphasis on zoonotic species *Echinococcus multilocularis* and *Trichinella* spp [J]. *Helminthologia*, 2009, 46(2): 73-79.
- [10] Lavikainen A, Lehtinen MJ, Laaksonen S, et al. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates of cervid origin from Finland and Sweden[J]. *Parasitology*, 2006, 133(5): 565-570.
- [11] Le TH, Pearson MS, Blair D, et al. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus* [J]. *Parasitology*, 2002, 124(1): 97-112.
- [12] Capuano F, Rinaldi L, Maurelli MP, et al. Cystic echinococcosis in water buffaloes: Epidemiological survey and molecular evidence of ovine (G1) and Buffalo (G3) strains [J]. *Vet Parasitol*, 2006, 137(3/4): 262-268.
- [13] Campos-Bueno A, Lopez-Abente G, Andres-Cercadillo AM. Risk factors for *Echinococcus granulosus* infection: a case-control study [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2000, 62(3): 329-334.
- [14] 赵月, 伍卫平. 空间统计学方法在棘球蚴病研究中的应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(3): 272-276.
- [15] 齐颜凤. 四川省阿坝州棘球蚴病分布特征和影响因素研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2013.
- [16] 史大中, 李文科, 包根书. 甘肃泡型包虫病流行与人为危险因素[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(8): 973-974.
- [17] 初向东, 王桂芝, 冯晓辉, 等. 新疆和布克赛尔蒙古自治县囊型包虫病危险因素分析[J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(3): 297-299.
- [18] 王虎. 青海省人体包虫病风险因素分析[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 17(4): 214-216.
- [19] 何伟, 尚婧晔, 黄燕, 等. 2007-2013年四川省包虫病疫情监测结果分析[J]. 预防医学情报杂志, 2016, 32(1): 83-85.
- [20] 何伟, 尚婧晔, 喻文杰, 等. 四川省石渠县包虫病流行病学现状调查[J]. 预防医学情报杂志, 2017, 33(9): 850-854.

【收稿日期】 2019-01-04 【编辑】 朱宏儒

(上接第392页)

- [7] Liu H, Shen Y, Yin J, et al. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, *Giardia* and *Cyclospora* in diarrheal outpatients in China[J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14: 25.
- [8] 韩范, 谭渭仙, 周性兰. 南京地区人体隐孢子虫 2 例报告[J]. 江苏医药, 1987, 13(12): 692-703.
- [9] 徐宁, 尹建海, 沈玉娟, 等. 隐孢子虫和蓝氏贾第鞭毛虫分子流行病学研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2018, 36(6): 661-665.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 生活饮用水标准检验方法微生物指标 (GB 5750.12-2006)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 19-30.
- [11] Clarke C, O'Connor L, Carre-Skinner HA, et al. Development and performance evaluation of a recombinase polymerase amplification assay for the rapid detection of group B streptococcus[J]. *BMC Microbiol*, 2016, 16(1): 221.
- [12] Eid C, Santiago JG. Assay for listeria monocytogenes cells in whole blood using isotachopheresis and recombinase polymerase amplification[J]. *Analyst*, 2017, 142(1): 48-54.
- [13] 郑伟, 徐琦, 罗鹏, 等. 重组酶介导扩增方法快速检测黄热病毒[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(1): 1-3.
- [14] 刘辉, 何艺梅, 王明阳, 等. 环介导等温扩增法快速检测食源性致病菌[J]. 食品分析与检测, 2018, 9(16): 4412-4416.
- [15] Adeyemo FE, Singh G, Reddy PA. Methods for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid based tools in clinical and environmental regimes [J]. *Acta Trop*, 2018, 184: 15-28.
- [16] 吕蓓, 程海荣, 严庆丰, 等. 体外核酸快速扩增技术的发展和不断创新[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(3): 91-96.
- [17] 杨子吟, 曹建平, 沈玉娟, 等. 几种新现人体隐孢子虫种和基因型流行现状[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(2): 148-155.
- [18] 史亚东, 董海聚, 王荣军, 等. 微小隐孢子虫 LAMP 检测方法的探索[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(12): 1195-1201.
- [19] 吴耀东. 隐孢子虫和弓形虫重组酶聚合酶扩增检测方法的建立及应用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [20] Bakheit MA, Torra D, Palomino LA, et al. Sensitive and specific detection of *Cryptosporidium* species in PCR-negative samples by loop-mediated isothermal DNA amplification and confirmation of generated LAMP products by sequencing [J]. *Vet Parasitol*, 2008, 158(1/2): 11-22.

【收稿日期】 2019-06-20 【编辑】 邓瑶