



王雪,李晶,兰卓,侯美如,杨彦,王佳文,刘雪薇,邱鸿宇,高俊峰,王春仁.淡水鱼中5种人兽共患吸虫囊蚴多重PCR检测方法的建立[J].中国农业大学学报,2025,30(07):161-173.

WANG Xue, LI Ben, LI Jing, LAN Zhuo, HOU Meiru, YANG Yan, WANG Jiawen, LIU Xuewei, QIU Hongyu, GAO Junfeng, WANG Chunren. Establishment of multiplex PCR for detection of five species of zoonotic trematode metacercariae in freshwater fish [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30 (07): 161-173.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.07.14

淡水鱼中5种人兽共患吸虫囊蚴多重PCR检测方法的建立

王雪¹ 李晶² 李晶² 兰卓¹ 侯美如¹ 杨彦¹ 王佳文¹ 刘雪薇¹
邱鸿宇¹ 高俊峰¹ 王春仁^{1*}

(1. 黑龙江八一农垦大学 动物科技学院/大庆市动物源性人兽共患病防控重点实验室, 黑龙江 大庆 163319;
2. 桦南县农业农村局 动物疫病预防控制中心, 黑龙江 桦南 154400)

摘要 为快速鉴别淡水鱼感染吸虫囊蚴的种类,基于GenBank中华支睾吸虫、东方次睾吸虫、横川后殖吸虫、日本棘隙吸虫和圆棘口吸虫参考序列的保守区域分别设计5对特异性引物,通过优化反应条件,建立同时检测5种吸虫囊蚴的多重PCR方法。结果显示:1)PCR反应体系中最佳引物组合浓度为10 μmol/L,最适退火温度为59℃,可同时扩增的各吸虫特异性片段,扁弯口吸虫、全冠吸虫、卷棘口吸虫、肝片吸虫和土耳其斯坦裂体吸虫的检测结果均为阴性;5种吸虫囊蚴重组质粒DNA最低检出浓度均为1 ng/μL;批间与批内试验均一致。2)通过单重PCR方法验证多重PCR检测结果,符合率为100%。3)采用多重PCR方法检测的100尾麦穗鱼中,21尾(21/100, 21%)阳性,8尾(8/100, 8%)为单病原感染,13尾(13/100, 13%)为多病原混合感染,华支睾吸虫、东方次睾吸虫、横川后殖吸虫、日本棘隙吸虫和圆棘口吸虫的阳性数分别为11(11%)、9(9%)、4(4%)、8(8%)和8(8%),与分别使用形态学方法及单重PCR验证结果相同。综上,本研究成功建立了同时检测淡水鱼华支睾吸虫、东方次睾吸虫、横川后殖吸虫、日本棘隙吸虫和圆棘口吸虫囊蚴的多重PCR方法,该方法具有特异性强、敏感性高、重复性好等优点,有望在鱼病检测、突发鱼源性公共卫生事件及出入境检验检疫中应用。

关键词 华支睾吸虫;东方次睾吸虫;横川后殖吸虫;日本棘隙吸虫;圆棘口吸虫;多重PCR

中图分类号 S855.9+9 **文章编号** 1007-4333(2025)07-0161-13 **文献标志码** A

Establishment of multiplex PCR for detection of five species of zoonotic trematode metacercariae in freshwater fish

WANG Xue¹, LI Ben², LI Jing², LAN Zhuo¹, HOU Meiru¹, YANG Yan¹, WANG Jiawen¹,
LIU Xuewei¹, QIU Hongyu¹, GAO Junfeng¹, WANG Chunren^{1*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine/Key Laboratory of Prevention and Control of Zoonotic Diseases of Daqing, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2. Center for Prevention and Control of Animal Diseases, Agricultural and Rural Bureau of Huanan County, Huanan 154400, China)

Abstract To rapidly identify the trematode metacercariae species infecting freshwater fish, five pairs of specific primers were designed based on the conserved regions of *Clonorchis sinensis*, *Metorchis orientalis*, *Metagonimus yokogawai*, *Echinochasmus japonicus* and *Echinostoma hortense* sequences in

收稿日期: 2024-10-18

基金项目: 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD2022C006);国家自然科学基金项目(31972703);国家重点研发项目(2017YFD0501306)

第一作者: 王雪(ORCID:0009-0008-8822-862X),硕士研究生,E-mail:wangxue20210427@163.com

通讯作者: 王春仁(ORCID:0000-0003-2726-2644),教授,主要从事分子寄生虫学与动物寄生虫病防控研究,E-mail:chunrenwang@sohu.com

GenBank, and a multiplex PCR method was established. The results showed that: 1) In the PCR reaction system, the optimal primer concentration was 10 $\mu\text{mol/L}$, the optimal annealing temperature was 59 $^{\circ}\text{C}$, and the specific fragments for each trematode species could be amplified simultaneously. The detected results of *Clinostomum complanatum*, *Holostephanus* sp., *Echinostoma revolutum*, *Fasciola hepatica* and *Schistosoma turkestanicum* were all negative. The minimum detectable concentration of recombinant plasmid DNA for five species trematode metacercariae was 1 ng/ μL ; Both inter-batch and intra-batch experiments were consistent. 2) The multiplex PCR detection results were validated by single PCR, and the coincidence rate was 100%. 3) Among the 100 *Pseudorasbora parva* samples detected by multiplex PCR, and 21 (21/100, 21%) were positive, eight (8/100, 8%) were single pathogen infections, and 13 (13/100, 13%) were mixed infections involving multiple pathogens. The positive rates for *C. sinensis*, *M. orientalis*, *M. yokogawai*, *E. japonicus* and *E. hortense* were 11 (11%), nine (9%), four (4%), eight (8%), and eight (8%), respectively, which were consistent with the results obtained by single PCR and morphological methods. In conclusion, this study successfully established a multiplex PCR method for the simultaneous detection of trematode metacercariae in fish, including *C. sinensis*, *M. orientalis*, *M. yokogawai*, *E. japonicus* and *E. hortense*. This method has the advantages of strong specificity, high sensitivity, and excellent repeatability, which is expected to be applied in fish disease detection, sudden fish related public health events, and entry-exit inspection and quarantine.

Keywords *Clonorchis sinensis*; *Metorchis orientalis*; *Metagonimus yokogawai*; *Echinochasmus japonicus*; *Echinostoma hortense*; multiplex PCR

在人类可感染的近百种人兽共患寄生虫中,经食物感染为最常见的感染途径,包括肉源性、鱼源性、螺源性、甲壳动物源性、两栖动物源性和节肢动物源性等途径。联合国粮食及农业组织(FAO)列出的10种重要水生动物源性人兽共患寄生虫中,后睾吸虫、异形吸虫、华支睾吸虫及棘口吸虫等均来自淡水鱼类。人和动物的感染主要是因为食入生的或未熟的含有吸虫囊蚴的淡水鱼,其中在我国对人危害严重的主要有华支睾吸虫、东方次睾吸虫、横川后殖吸虫、日本棘隙吸虫和圆圃棘口吸虫。

华支睾吸虫(*Clonorchis sinensis*)主要寄生在人及多种动物的肝胆管及胆囊中,是一种非常重要的鱼源性人兽共患寄生虫,我国是全球感染华支睾吸虫人数最多的国家^[1],麦穗鱼等100多种淡水鱼为其中间宿主。东方次睾吸虫(*Metorchis orientalis*)主要寄生在犬、猫和家禽的胆管和胆囊,也感染人,麦穗鱼等10多种淡水鱼为其中间宿主。横川后殖吸虫(*Metagonimus yokogawai*)主要寄生于犬、猫和鸟类肠道,人感染在日本和韩国比较广泛^[2-3],我国也有零星报道^[4-5],目前已被WHO列为可引起人感染的重要人兽共患吸虫病原^[6],中间宿主为蛇鮈、唇鲮、麦穗鱼和花骨鱼等。日本棘隙吸虫(*Echinochasmus japonicus*)主要寄生于犬、猫、家禽及野生鸟类小肠,在我国一些地区呈地方性流行^[7],

其中间宿主主要为泥鳅和麦穗鱼。圆圃棘口吸虫(*Echinostoma hortense*)主要寄生于鸟类及哺乳动物的小肠,其囊蚴寄生于泥鳅、麦穗鱼的肌肉内,在我国,有很多因生食泥鳅感染圆圃棘口吸虫的报道^[8-10]。由此可以看出,这些吸虫的囊蚴均寄生于淡水鱼,本团队对黑龙江省淡水鱼寄生虫感染的调查结果也证明了这点。2020—2023年共对30种12445条淡水鱼进行了调查,共检出病原31种,其中9种为人兽共患病原,包括华支睾吸虫、东方次睾吸虫、台湾次睾吸虫、圆圃棘口吸虫、日本棘隙吸虫、横川后殖吸虫、扁弯口吸虫7种吸虫囊蚴,涵盖几乎所有鱼种,麦穗鱼为多种吸虫的适宜宿主,仅华支睾吸虫囊蚴感染率就达17.66%,阳性鱼每克鱼肉平均感染强度为24个^[11]。

这些人兽共患吸虫主要是因生食或半生食含有囊蚴的淡水鱼而感染。由于很多吸虫感染的鱼种相同,且多为混合感染,囊蚴形态相似,缺乏典型特征,形态学鉴定难度较大,且比较费时,即使熟手也极易造成误判。分子生物学方法解决了这一难题,PCR技术以高效、快速、低成本的优势在寄生虫的检验上得到广泛应用,特别是对人兽共患病原的检验检疫^[12-13]。但普通PCR,仅能检测一种病原,多重PCR是在同一PCR反应体系里加上2对以上引物,同时扩增出多个核酸片段的PCR反应,可以

用于多病原检测。Tantrawatpan等^[14]建立了4种棘口吸虫的多重PCR方法,并利用该方法在泰国开展了棘口吸虫的流行病学调查研究。高俊峰等^[15]分别以华支睾吸虫、东方次睾吸虫和日本全冠吸虫的*nad5*、*nad2*和ITS基因序列为目的基因,建立了用于快速检测以上3种病原的多重PCR方法。梅雪芳等^[16]建立了横川后殖吸虫与扇棘单睾吸虫二重PCR鉴别方法。

鱼源性人兽共患吸虫在我国具有较高的感染率,严重影响动物生产和人类健康,加强淡水产品中人兽共患吸虫的快速、准确检测非常重要。然而,目前关于淡水鱼多种人兽共患吸虫的分子检测还未见报道。因此,本研究拟以淡水鱼常见的华支睾吸虫、东方次睾吸虫、横川后殖吸虫、日本棘隙吸虫和圆圃棘口吸虫为对象,分别以*nad5*、*nad1*、*cox1*、18S rDNA和*cox1*为靶基因,建立5种吸虫囊蚴的多重PCR检测方法,填补鱼源性人兽共患吸虫多病原同步检测的技术空白,为鱼类养殖、突发鱼源性公共卫生事件及出入境检验检疫中鱼源性人兽共患吸虫的快速检测提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源

华支睾吸虫(*C. sinensis*)、东方次睾吸虫(*M. orientalis*)、横川后殖吸虫(*M. yokogawai*)、日本棘隙吸虫(*E. japonicus*)和圆圃棘口吸虫(*E. hortense*)的囊蚴及用于对照试验的扁弯口吸虫囊蚴(*Clinostomum complanatum*)、全冠吸虫囊蚴(*Holostephanus* sp.)、卷棘口吸虫(*E. revolutum*)、肝片吸虫(*Fasciola hepatica*)和土耳其斯坦裂体吸虫(*Schistosoma turkestanicum*)均为本实验室采集保存。本研究方案经黑龙江八一农垦大学动物伦理委员会批准(伦理号:DWKJXY2022020)。

1.1.2 主要试剂

组织DNA小剂量提取试剂盒购自OMEGA biotek公司;2×Taq Plus Master Mix和DL 2 000 Marker均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;pMD-18T Vector购自大连TaKaRa公司;DH5α感受态细胞购自北京博迈德基因技术有限公司;DNA Gel Extraction Kit购自康宁生命科学有限公司和Plasmid Mini-prep Kit购自北京天根生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 吸虫囊蚴的收集及鉴定

采集淡水鱼,剪下背鳍周围肌肉进行压片初步镜检,如检查到吸虫囊蚴,则参照文献方法收集囊蚴^[17]。简单讲,就是将鱼清洗干净,去除鱼头、鳍、尾和内脏,用绞肉机将鱼加工成肉泥,人工胃液37℃消化4 h左右,经铜筛过滤后,取沉淀在体式显微镜下分离囊蚴,取单个囊蚴进行形态鉴定,同种吸虫囊蚴置于同一离心管中,计数后保存于生理盐水中,4℃冰箱中备用。

1.2.2 囊蚴基因组提取

由于囊蚴体积较小,为保证基因组提取过程无误,囊蚴的分离在解剖体视镜下完成。然后提取单个囊蚴总DNA。操作过程严格按照OMEGA基因组提取试剂盒说明执行。

1.2.3 引物设计及合成

分别针对华支睾吸虫、东方次睾吸虫、横川后殖吸虫、日本棘隙吸虫和圆圃棘口吸虫线粒体基因和核糖体序列中的种内保守、种间特异的基因,使用Primer 5.0和Oligo 6设计各自引物(表1)。引物由库美(吉林)生物科技有限公司合成。

1.2.4 重组质粒标准品制备

分别以5种吸虫囊蚴的核酸为模板,对应使用表1中的引物进行单重PCR扩增,扩增体系为25 μL,上下游引物(10 μmol/L)各0.5 μL, DNA模板1 μL, 2×Taq Plus Master Mix 12.5 μL, 加ddH₂O补足至25 μL。PCR反应程序:95℃预变性5 min;95℃变性50 s、59℃退火1 min、70℃延伸1 min,共33个循环;72℃终延伸7 min,最后降温至4℃保存。反应结束后,取3 μL的PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

将回收的5个基因片段与pMD-18T载体连接,连接体系10 μL, Solution I 5 μL, pMD-18T 0.5 μL, 胶回收产物4.5 μL, 4℃环境下连接6 h。连接结束后再将其转化至DH5α大肠杆菌感受态细胞,均匀涂布于含有抗生素Amp、IPTG和X-Gal的LB固体培养基上,37℃恒温过夜培养12 h。次日挑取经蓝白斑筛选而生的单一白色菌落,接种于含有抗生素Amp的LB液体培养基中,置于37℃摇床中220 r/min振荡培养4~5 h。利用菌液通用引物进行PCR鉴定,成功扩增阳性条带后,使用TIANprep Mini Plasmid Kit提取质粒,操作过程严

表 1 5种吸虫囊蚴特异性引物序列信息

Table 1 Information of specific primer sequences for the five species trematode metacercariae

虫种 Species	靶基因 Target gene	引物 Primer	引物序列 Primer sequence	产物大小/bp Product length	退火温度/℃ Annealing temperature
华支睾吸虫 <i>C. sinensis</i>	<i>nad5</i>	CSF	5'-CGGAGTATGCGGGCTTCTTT-3'	560	57~60
		CSR	5'-AAATACACACCCACCGCACT-3'		
东方次睾吸虫 <i>M. orientalis</i>	<i>nad1</i>	MOF	5'-TGCTTTTGGTTACTAGGCTGACT-3'	310	56~60
		MOR	5'-CCTCACCAACTCCCTCTCAG-3'		
横川后殖吸虫 <i>M. yokogawai</i>	<i>cox1</i>	MYF	5'-CCTTTTGTGCTCTCCTTGC-3'	907	56~60
		MYR	5'-ATTCAAGACTACAGATTTAC-3'		
日本棘隙吸虫 <i>E. japonicus</i>	18S rDNA	EJF	5'-CATACCTTCAAACGGTGAAA-3'	1 810	57~60
		EJR	5'-AATGGCACCAATCCGAGGAC-3'		
圆圃棘口吸虫 <i>E. hortense</i>	<i>cox1</i>	EHF	5'-TGGTATTGTGAGACATATTTGTA-3'	212	59~61
		EHR	5'-AAAACACCTTAATACCCGTAGGA-3'		

格按照试剂盒说明书执行。最后送至库美(吉林)生物科技有限公司进行测序,测序完成后将构建成功的重组质粒标准品的浓度统一稀释为100 ng/ μL ,用于后续试验。

1.2.5 单重PCR退火温度的确定

分别以5种吸虫囊蚴基因组的重组质粒为模板,加入各特异性引物,在不同退火温度下扩增与其相应的*nad5*、*nad1*、*cox1*、18S rDNA和*cox1*基因片段。PCR反应体系25 μL :DNA模板1 μL ,2 $\times$ *Taq* Plus Master Mix 12.5 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各0.5 μL ,加入ddH₂O 10.5 μL 。PCR反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性50 s、分别以56、57、58、59、60和61 $^{\circ}\text{C}$ 退火1 min、68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min 30 s、共33个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸7 min。反应结束后取3 μL 产物,在1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳,检查扩增结果,将成功扩增目的条带的产物送至库美(吉林)生物科技有限公司进行测序。

1.2.6 单重PCR特异性检验

1)根据1.2.5确定的退火温度和反应条件对设计的5对引物进行单重PCR特异性检验。分别以5种吸虫囊蚴基因组的重组质粒、扁弯口吸虫囊蚴、全冠吸虫囊蚴、卷棘口吸虫、肝片吸虫和土耳其斯坦裂体吸虫的基因组DNA为模板,将5对特异性引物(CSF/CSR、MOF/MOR、MYF/MYR、EJF/EJR、EHF/EHR)分别加入含有不同模板的反应管中,再分别加入2 $\times$ *Taq* Plus Master Mix和ddH₂O,扩增目的基因片段,反应结束后电泳检测。PCR反应体系为2 $\times$ *Taq* Plus Master Mix用量为12.5 μL ,模板为1 μL ,上下游

引物(10 $\mu\text{mol/L}$)为0.5 μL ,ddH₂O为10.5 μL ,总体积25 μL 。

2)在5个PCR反应管中分别加入CSF/CSR、MOF/MOR、MYF/MYR、EJF/EJR、EHF/EHR引物,每个反应管均加入5种吸虫囊蚴基因组的重组质粒、扁弯口吸虫囊蚴、全冠吸虫囊蚴、卷棘口吸虫、肝片吸虫和土耳其斯坦裂体吸虫的基因组DNA,再加入2 $\times$ *Taq* Plus Master Mix和ddH₂O,扩增目的基因片段,反应结束后电泳检测。PCR反应体系为2 $\times$ *Taq* Plus Master Mix用量为12.5 μL ,华支睾吸虫*nad5*质粒为0.5 μL ,东方次睾吸虫*nad1*质粒为0.5 μL ,横川后殖吸虫*cox1*质粒为0.5 μL ,日本棘隙吸虫18S rDNA质粒为0.5 μL ,圆圃棘口吸虫*cox1*质粒为0.5 μL ,扁弯口吸虫囊蚴、全冠吸虫囊蚴、卷棘口吸虫、肝片吸虫和土耳其斯坦裂体吸虫DNA模板均为0.5 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)为0.5 μL ,ddH₂O为10.5 μL ,总体积25 μL 。

1.2.7 单重PCR敏感性检验

将5种吸虫囊蚴基因组的重组质粒进行10倍梯度稀释,分别为 $1\times 10^2\sim 1\times 10^{-5}$ ng/ μL ,在PCR反应管中分别加入单一的特异性引物对,并加入相应稀释浓度的重组质粒,再加入2 $\times$ *Taq* Plus Master Mix和ddH₂O。以1.2.4确定退火温度后的反应程序为反应体系和反应条件。反应结束后电泳检测。

1.2.8 多重PCR退火温度的确定

将构建的5种吸虫囊蚴的重组质粒等比混合,命名为5-plex,以此为模板同时加入5对引物,在不同退

火温度下扩增 *nad5*、*nad1*、*cox1*、18S rDNA、*cox1* 基因。

多重PCR反应体系为 $2\times$ *Taq* Plus Master Mix 用量为 12.5 μL , 5种囊蚴质粒混合模板为 2 μL , CSF/CSR (10 $\mu\text{mol/L}$) 为 0.3 μL , MOF/MOR (10 $\mu\text{mol/L}$) 为 0.3 μL , MYF/MYR (10 $\mu\text{mol/L}$) 为 0.3 μL , EJF/EJR (10 $\mu\text{mol/L}$) 为 0.3 μL , EHF/EHR (10 $\mu\text{mol/L}$) 为 0.3 μL , ddH₂O 为 7.5 μL , 总体积 25 μL 。

PCR反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 59/60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 30 s, 共 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 7 min。反应结束后, 取 3 μL 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶内电泳检测。

1.2.9 多重PCR特异性检验

在 5 个 PCR 反应管中均加入 CSF/CSR、MOF/MOR、MYF/MYR、EJF/EJR、EHF/EHR 引物, 每个反应管均加入 5 种吸虫囊蚴重组质粒的混合模板, 再分别加入扁弯口吸虫囊蚴、全冠吸虫囊蚴、卷棘口吸虫、肝片吸虫和土耳其斯坦裂体吸虫的基因组 DNA, 最后加入 $2\times$ *Taq* Plus Master Mix 和 ddH₂O, 扩增目的基因片段, 反应结束后电泳检测。

PCR反应体系为 $2\times$ *Taq* Plus Master Mix 用量为 12.5 μL , 5种囊蚴质粒混合模板为 2 μL , 对照组吸虫 DNA 模板均为 1 μL , CSF/CSR (10 $\mu\text{mol/L}$) 为 0.3 μL , MOF/MOR (10 $\mu\text{mol/L}$) 为 0.3 μL , MYF/MYR (10 $\mu\text{mol/L}$) 为 0.3 μL , EJF/EJR (10 $\mu\text{mol/L}$) 为 0.3 μL , EHF/EHR (10 $\mu\text{mol/L}$) 为 0.3 μL , ddH₂O 为 6.5 μL , 总体积 25 μL 。

PCR反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 30 s, 共 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 7 min。反应结束后, 取 3 μL 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶内电泳检测。

1.2.10 多重PCR敏感性检验

将 5 种吸虫囊蚴重组质粒的混合模板进行 10 倍梯度稀释, 分别为 $1\times 10^2\sim 1\times 10^{-5}$ ng/ μL 。在 8 个 PCR 反应管均加入 CSF/CSR、MOF/MOR、MYF/MYR、EJF/EJR、EHF/EHR, 并分别加入稀释为不同浓度的模板, 同时加入 $2\times$ *Taq* Plus Master Mix 和 ddH₂O, 扩增目的基因片段。

多重PCR反应体系为 $2\times$ *Taq* Plus Master Mix 用量为 12.5 μL , 5种囊蚴质粒混合模板为 2 μL , CSF/CSR (10 $\mu\text{mol/L}$) 为 0.3 μL , MOF/MOR (10 $\mu\text{mol/L}$) 为 0.3 μL , MYF/MYR (10 $\mu\text{mol/L}$) 为 0.3 μL , EJF/EJR (10 $\mu\text{mol/L}$) 为 0.3 μL , EHF/EHR (10 $\mu\text{mol/L}$) 为 0.3 μL , ddH₂O 为 7.5 μL , 总体积 25 μL 。

0.3 μL , ddH₂O 为 7.5 μL , 总体积 25 μL 。

PCR反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 30 s, 共 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 7 min。反应结束后, 取 3 μL 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶内电泳检测。

1.2.11 多重PCR的临床样本检测与验证

随机选择麦穗鱼 100 尾, 取鳃丝和胸背腹肌肉 (带鱼鳞) 各 0.2 g, 液氮研磨为碎渣后, 提取基因组 DNA, 以此为模板, 使用建立的多重 PCR 方法检测麦穗鱼囊蚴感染情况, 同时分别使用形态学方法和单重 PCR 方法对多重 PCR 检测结果进行复核。

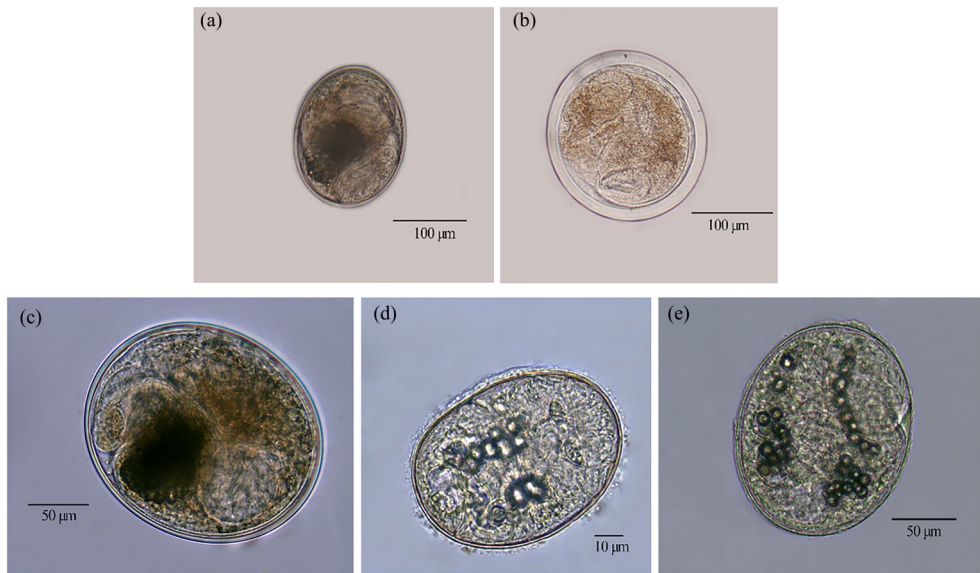
2 结果与分析

2.1 5种吸虫囊蚴的形态特征

华支睾吸虫囊蚴呈椭圆形, 大小为 160~200 μm , 囊壁极薄, 后尾蚴蜷缩在囊壁内, 两吸盘清晰可见, 腹吸盘大于口吸盘, 排泄囊随尾蚴移动而变化, 大多数情况下近似 O 形 (图 1(a))。东方次睾吸虫囊蚴呈圆形, 大小为 170~220 μm , 与华支睾吸虫囊蚴较为相似, 但两者囊壁厚度差异较大, 该虫体囊壁较厚, 后尾蚴位于囊壁内, 两吸盘清晰可见且大小近乎相等 (图 1(b))。横川后殖吸虫囊蚴近似球形, 大小为 210~260 μm , 囊壁较薄仅一层, 后尾蚴蜷缩于囊壁内呈不规则转动, 两吸盘清晰可见, 腹吸盘大小约为口吸盘 2 倍, 排泄囊近似 O 形 (图 1(c))。日本棘隙吸虫囊蚴呈椭圆形, 大小为 70~95 μm , 囊壁较薄且仅有一层, 口吸盘位于体前部, 其内附有小棘 16 枚, 腹吸盘位于体后部 (图 1(d))。圆圃棘口吸虫囊蚴近似球形, 大小为 150~185 μm , 囊壁一层, 较薄, 口吸盘位于囊蚴顶部, 两侧附有颗粒, 每侧 13~18 个 (图 1(e))。除横川后殖吸虫囊蚴形态与 Li 等^[18]对横川后殖吸虫囊蚴的描述一致外, 其他 4 种吸虫囊蚴均与张莹^[17]对相关吸虫囊蚴的描述相同, 故鉴定为相应吸虫囊蚴。

2.2 重组质粒标准品的构建与鉴定

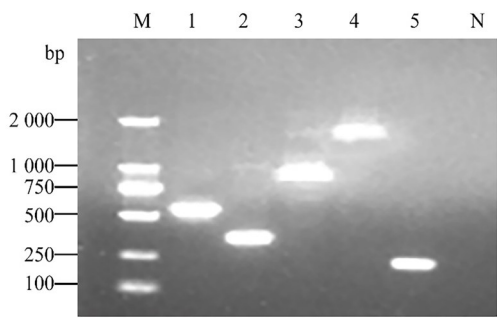
重组质粒的菌液 PCR 电泳结果显示, 华支睾吸虫、东方次睾吸虫、横川后殖吸虫、日本棘隙吸虫和圆圃棘口吸虫扩增片段分别为 560、310、907、1 810 和 212 bp, 与预期条带相符 (图 2)。所构建的重组质粒测序结果与 NCBI GenBank 中华支睾吸虫 *nad5* (KC170220)、东方次睾吸虫 *nad1* (KY232061)、横川后殖吸虫 *cox1* (LC805480)、日本棘隙吸虫 18S rDNA (LT904764) 和圆圃棘口吸虫



(a)华支睾吸虫囊蚴;(b)东方次睾吸虫囊蚴;(c)横川后殖吸虫囊蚴;(d)日本棘隙吸虫囊蚴;(e)圆圃棘口吸虫囊蚴。
(a) *C. sinensis*;(b) *M. orientalis*;(c) *M. yokogawai*;(d) *E. japonicus*;(e) *E. hortense*.

图1 5种吸虫囊蚴的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of five species of trematode metacercariae



M: DL 2 000 分子质量标准;泳道 1~5: pCs-*nad5*、pMo-*nad1*、pMy-*cox1*、pEj-18S、pEh-*cox1*; N: 阴性对照。
M: DL 2 000 DNA Maker; Lane 1-5: pCs-*nad5*, pMo-*nad1*, pMy-*cox1*, pEj-18S, pEh-*cox1*; N: Negative control.

图2 5种吸虫囊蚴重组质粒的构建

Fig. 2 Construction of recombinant plasmids of five species of trematode metacercariae

cox1(AF025826)的相似性均为100%,证明5种吸虫囊蚴重组质粒构建成功。为方便后续试验使用,将其命名为pCs-*nad5*、pMo-*nad1*、pMy-*cox1*、pEj-18S和pEh-*cox1*。

2.3 单重PCR退火温度的确定

2.3.1 华支睾吸虫 *nad5* 基因片段退火温度的确定

分别以56、57、58、59、60和61℃的退火温度扩增pCs-*nad5*,在退火温度57、58、59和60℃时,扩增出一条与目的大小相同的560 bp的条带,在退火温度56和61℃时,未见条带。根据PCR扩增结果,华

支睾吸虫 *nad5* 基因的适宜退火温度为57、58、59和60℃(图3(a))。

2.3.2 东方次睾吸虫 *nad1* 基因片段退火温度的确定

分别以56、57、58、59、60和61℃的退火温度扩增pMo-*nad1*,在退火温度56、57、58、59和60℃时,扩增出一条与目的大小相同的310 bp的条带,在退火温度61℃时,未见条带。根据PCR扩增结果,东方次睾吸虫 *nad1* 基因的适宜退火温度为56、57、58、59和60℃(图3(b))。

2.3.3 横川后殖吸虫 *cox1* 基因片段退火温度的确定

分别以56、57、58、59、60和61℃的退火温度扩增pMy-*cox1*,在退火温度56、57、58、59和60℃时,扩增出一条与目的大小相同的907 bp的条带,在退火温度61℃时,未见条带。根据PCR扩增结果,横川后殖吸虫 *cox1* 基因的适宜退火温度为56、57、58、59和60℃(图3(c))。

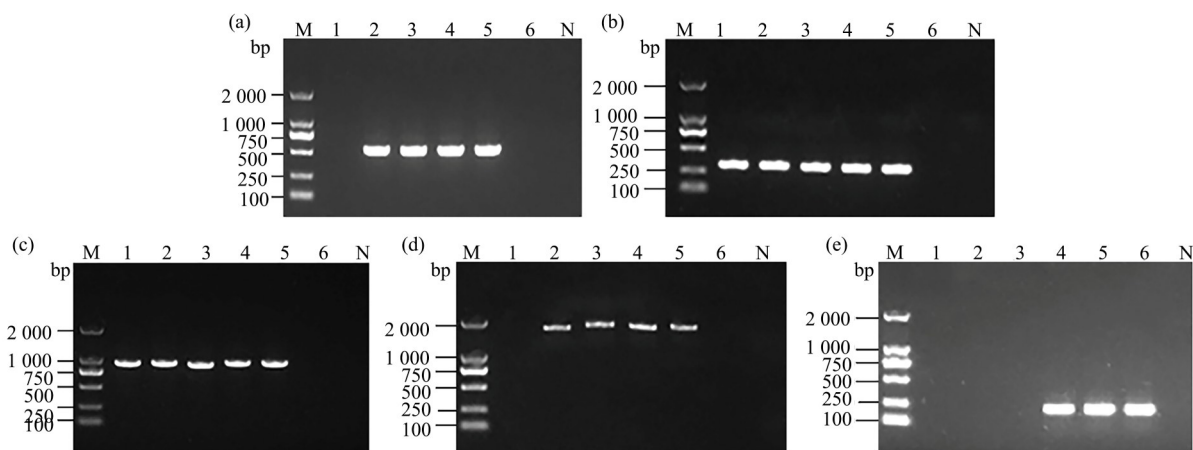
2.3.4 日本棘隙吸虫 18S rDNA 基因片段退火温度的确定

分别以56、57、58、59、60和61℃的退火温度扩增pEj-18S,在退火温度57、58、59和60℃时,扩增出一条与目的大小相同的1 810 bp的条带,在退火温度56和61℃时,未见条带。根据PCR扩增结果,日本棘隙吸虫 18S rDNA 基因的适宜退火温度为57、58、59和60℃(图3(d))。

2.3.5 圆圃棘口吸虫 *cox1* 基因片段退火温度的确定

分别以56、57、58、59、60和61℃的退火温度扩增 pEh-*cox1*,在退火温度59、60和61℃时,扩增出一条与

目的大小相同的212 bp的条带,在退火温度56、57和58℃时,未见条带。根据PCR扩增结果,圆圃棘口吸虫 *cox1* 基因的适宜退火温度为59、60和61℃(图3(e))。



M: DL 2 000 DNA 分子质量标准;泳道1~6:56~61℃;N:阴性对照。

M: DL 2 000 DNA Maker; Lane 1-6: 56-61℃; N: Negative control.

(a) pCs-*nad5*; (b) pMo-*nad1*; (c) pMy-*cox1*; (d) pEj-18S; (e) pEh-*cox1*.

图3 5种吸虫囊蚴扩增退火温度的优化及筛选

Fig. 3 Optimization and screening of annealing temperature for amplification of five species of trematode metacercariae

综合5个基因片段的PCR扩增结果,共同退火温度为59、60℃,为保证PCR反应的特异性,在后续试验均使用59℃作为所有PCR反应的退火温度。

2.4 单重PCR特异性检验

2.4.1 华支睾吸虫特异性检验

在分别加入 pCs-*nad5*、pMo-*nad1*、pMy-*cox1*、pEj-18S、pEh-*cox1*、扁弯口吸虫、全冠吸虫、卷棘口吸虫、肝片吸虫和土耳其斯坦裂体吸虫的基因组的PCR反应体系中,加入CSF/CSR引物进行PCR反应,结果只有加入 pCs-*nad5*的PCR反应中扩增出 *nad5* 基因。加入其他对照虫株基因组的PCR反应体系及阴性对照没有扩增出任何条带,说明在单重PCR反应中CSF/CSR引物对华支睾吸虫具有良好的特异性(图4(a))。

2.4.2 东方次睾吸虫特异性检验

在分别加入不同基因组的PCR反应体系中,加入MOF/MOR引物进行PCR反应,结果只有加入 pMo-*nad1*的PCR反应中扩增出 *nad1* 基因。加入其他对照虫株基因组的PCR反应体系和阴性对照没有扩增出任何条带,说明在单重PCR反应中MOF/MOR引物对东方次睾吸虫具有良好的特异性(图4(b))。

2.4.3 横川后殖吸虫特异性检验

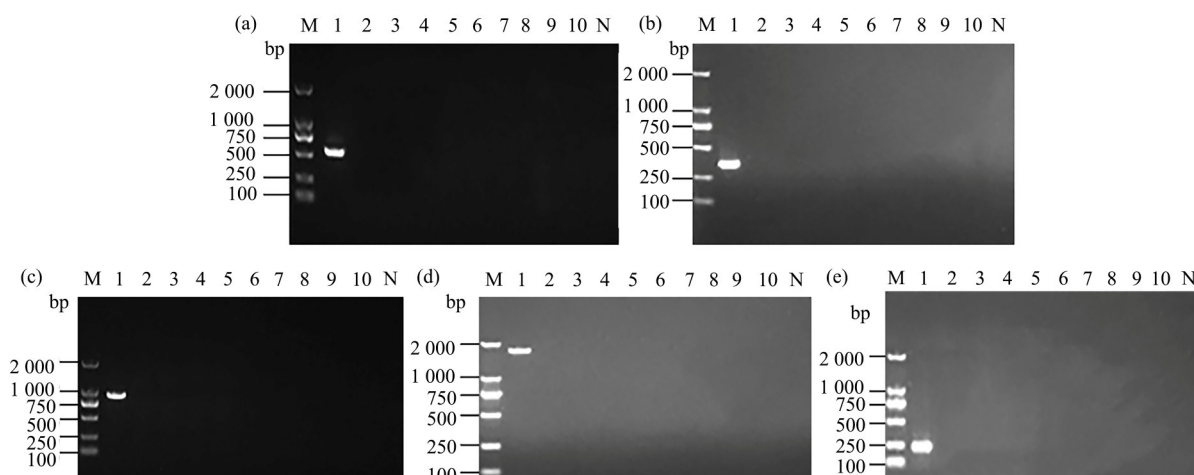
在分别加入不同基因组的PCR反应体系中,加入MYF/MYR引物进行PCR反应,结果只有加入 pMy-*cox1*的PCR反应中扩增出 *cox1* 基因。加入其他对照虫株基因组的PCR反应体系没有扩增出任何条带,阴性对照也未扩增出条带,说明在单重PCR反应中MYF/MYR引物对横川后殖吸虫具有良好的特异性(图4(c))。

2.4.4 日本棘隙吸虫特异性检验

在分别加入不同基因组的PCR反应体系中,加入EJF/EJR引物进行PCR反应,结果只有加入 pEj-18S的PCR反应中扩增出18S rDNA基因。加入其他对照虫株基因组的PCR反应体系没有扩增出任何条带,阴性对照也未扩增出条带,说明在单重PCR反应中EJF/EJR引物对日本棘隙吸虫具有良好的特异性(图4(d))。

2.4.5 圆圃棘口吸虫特异性检验

在分别加入不同基因组的PCR反应体系中,加入EHF/EHR引物进行PCR反应,结果只有加入 pEh-*cox1*的PCR反应中扩增出 *cox1* 基因。加入其他对照虫株基因组的PCR反应体系没有扩增出任何条带,阴性对照也未扩增出条带,说明在单重PCR反应中EHF/EHR引物对圆圃棘口吸虫具有良好的特异性(图4(e))。



M: DL 2 000 分子质量标准; (a) CSF/CSR 引物的特异性检验, 泳道 1~5: pCs-nad5, pMo-nad1, pMy-cox1, pEj-18S, pEh-cox1; (b) MOF/MOR 引物的特异性检验, 泳道 1~5: pMo-nad1, pCs-nad5, pMy-cox1, pEj-18S, pEh-cox1; (c) MYF/MYR 引物的特异性检验, 泳道 1~5: pMy-cox1, pCs-nad5, pMo-nad1, pEj-18S, pEh-cox1; (d) EJF/EJR 引物的特异性检验, 泳道 1~5: pEj-18S, pCs-nad5, pMo-nad1, pMy-cox1, pEh-cox1; (e) EHF/EHR 引物的特异性检验, 泳道 1~5: pEh-cox1, pCs-nad5, pMo-nad1, pMy-cox1, pEj-18S; 泳道 6~10: 扁弯口吸虫、全冠吸虫、卷棘口吸虫、肝片吸虫和土耳其斯坦裂体吸虫 DNA; N: 阴性对照。

M: DL 2 000 Marker; (a) Detection of the specificity of primers CSF/CSR, Lane 1-5: pCs-nad5, pMo-nad1, pMy-cox1, pEj-18S, pEh-cox1; (b) Detection of the specificity of primers MOF/MOR, Lane 1-5: pMo-nad1, pCs-nad5, pMy-cox1, pEj-18S, pEh-cox1; (c) Detection of the specificity of primers MYF/MYR, Lane 1-5: pMy-cox1, pCs-nad5, pMo-nad1, pEj-18S, pEh-cox1; (d) Detection of the specificity of primers EJF/EJR, Lane 1-5: pEj-18S, pCs-nad5, pMo-nad1, pMy-cox1, pEh-cox1; (e) Detection of the specificity of primers EHF/EHR, Lane 1-5: pEh-cox1, pCs-nad5, pMo-nad1, pMy-cox1, pEj-18S; Lane 6-10: *C. complanatum*, *Holostephanus* sp., *E. revolutum*, *F. hepatica*, *S. turkestanicum* DNA; N: Negative control.

图4 5种吸虫囊蚴单重PCR特异性分析

Fig. 4 Specificity analysis of single PCR for five species of trematode metacercariae

2.4.6 加入多虫株基因组验证单重PCR的特异性

5个PCR反应体系中加入pCs-nad5、pMo-nad1、pMy-cox1、pEj-18S、pEh-cox1、扁弯口吸虫、全冠吸虫、卷棘口吸虫、肝片吸虫和土耳其斯坦裂体吸虫的基因组,并分别加入5对引物。结果显示,在加入CSF/CSR、MOF/MOR、MYF/MYR、EJF/EJR、EHF/EHR的反应体系中,均成功扩增出目的基因片段,且无其他条带,进一步说明了所设计引物的特异性(图5)。

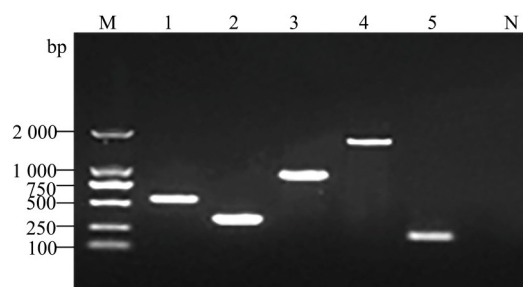
2.5 单重PCR敏感性检验

2.5.1 华支睾吸虫敏感性检验

分别以 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-2}$ ng/ μ L的pCs-nad5为模板,检测PCR方法的敏感性。扩增结果显示,nad5基因在 1×10^{-2} ng/ μ L浓度时无法检出,即nad5基因的最低检出限为 1×10^{-1} ng/ μ L(图6(a))。

2.5.2 东方次睾吸虫敏感性检验

分别以 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-1}$ ng/ μ L的pMo-nad1为模板,检测PCR方法的敏感性。扩增结果显示,nad1基因在 1×10^{-1} ng/ μ L浓度时无法检出,即nad1基因



M: DL 2 000 分子质量标准; 1~5泳道: CSF/CSR、MOF/MOR、MYF/MYR、EJF/EJR、EHF/EHR; N: 阴性对照。

M: DL 2 000 Marker; Lane 1-5: CSF/CSR, MOF/MOR, MYF/MYR, EJF/EJR, EHF/EHR; N: Negative control.

图5 5种吸虫囊蚴引物特异性验证

Fig. 5 Specificity verification of five primers for metacercariae of trematodes

的最低检出限为1 ng/ μ L(图6(b))。

2.5.3 横川后殖吸虫敏感性检验

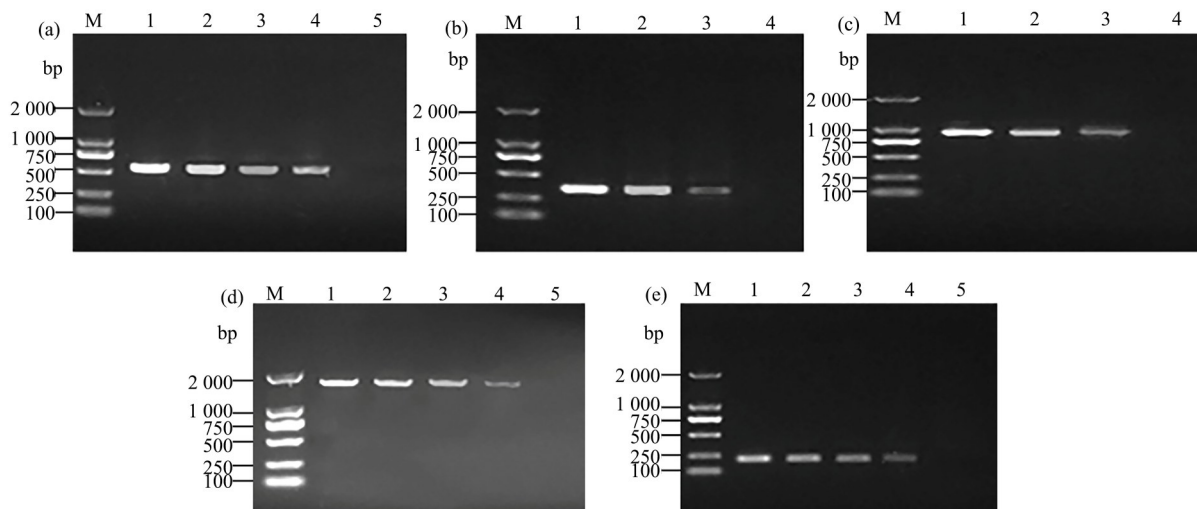
分别以 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-1}$ ng/ μ L的pMy-cox1为模板,检测PCR方法的敏感性。扩增结果显示,cox1基因在 1×10^{-1} ng/ μ L浓度时无法检出,即cox1基因的最低检出限为1 ng/ μ L(图6(c))。

2.5.4 日本棘隙吸虫敏感性检验

分别以 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-2}$ ng/ μ L的 pEj-18S为模板,检测PCR方法的敏感性。扩增结果显示,18S rDNA基因在 1×10^{-2} ng/ μ L浓度时无法检出,即18S rDNA基因的最低检出限为 1×10^{-1} ng/ μ L(图6(d))。

2.5.5 圆圃棘口吸虫敏感性检验

分别以 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-2}$ ng/ μ L的 pEh-cox1为模板,检测PCR方法的敏感性。扩增结果显示,cox1基因在 1×10^{-2} ng/ μ L浓度时无法检出,即cox1基因的最低检出限为 1×10^{-1} ng/ μ L(图6(e))。



M:DL 2 000 分子质量标准;(a) pCs-nad5单重PCR方法的敏感性,1~5泳道: $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-2}$ ng/ μ L;(b) pMo-nad1单重PCR方法的敏感性,1~4泳道: $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-1}$ ng/ μ L;(c) pMy-cox1单重PCR方法的敏感性,1~4泳道: $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-1}$ ng/ μ L;(d) pEj-18S单重PCR方法的敏感性,1~5泳道: $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-2}$ ng/ μ L;(e) pEh-cox1单重PCR方法的敏感性,1~5泳道: $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-2}$ ng/ μ L。

M: DL 2 000 Marker; (a) Sensitivity of PCR for the detection of pCs-nad5, Lane 1-5: $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-2}$ ng/ μ L; (b) Sensitivity of PCR for the detection of pMo-nad1, Lane 1-4: $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-1}$ ng/ μ L; (c) Sensitivity of PCR for the detection of pMy-cox1, Lane 1-4: $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-1}$ ng/ μ L; (d) Sensitivity of PCR for the detection of pEj-18S, Lane 1-5: $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-2}$ ng/ μ L; (e) Sensitivity of PCR for the detection of pEh-cox1, Lane 1-5: $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-2}$ ng/ μ L。

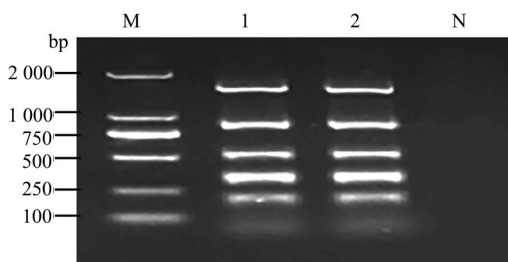
图6 5种吸虫囊蚴的敏感性试验

Fig. 6 Sensitivity experiment of five primers for metacercariae of trematodes

2.6 多重PCR退火温度的确定

将 pCs-nad5、pMo-nad1、pMy-cox1、pEj-18S和pEh-cox1等比混合,为方便使用,将混合模板命名为5-plex。分别以59和60℃的退火温度扩增5-

plex。结果显示,2种退火温度均成功扩增出5条与目的片段大小的560、310、907、1 810和212 bp的条带(图7)。为保证特异性,后续试验过程中以59℃作为所有PCR反应的退火温度。



M:DL 2 000 分子质量标准;1~2泳道的退火温度:59、60℃;N:阴性对照。

M: DL 2 000 Marker; Lane 1-2: 59, 60℃; N: Negative control.

图7 多重PCR退火温度的优化

Fig. 7 Optimization of annealing temperature for multiplex PCR

2.7 多重PCR特异性和敏感性检验

在加入5-plex及5对引物的反应体系中成功扩

增出 pCs-nad5、pMo-nad1、pMy-cox1、pEj-18S和pEh-cox1基因片段,在分别加入扁弯口吸虫、全冠吸

虫、卷棘口吸虫、肝片吸虫和土耳其斯坦裂体吸虫模板及5对引物的反应体系中,均未扩增出条带,说明在多重PCR反应中CSF/CSR、MOF/MOR、MYF/MYR、EJF/EJR和EHF/HER引物具有较强的特异性(图8(a))。

分别以 $1\times 10^2\sim 1\times 10^{-2}$ ng/ μ L的5-plex为模板,检测多重PCR方法的敏感性。扩增结果显示,多重PCR在 1×10^{-1} ng/ μ L浓度时无法全部检出,即多重PCR引物最低检出限为1 ng/ μ L(图8(b))。

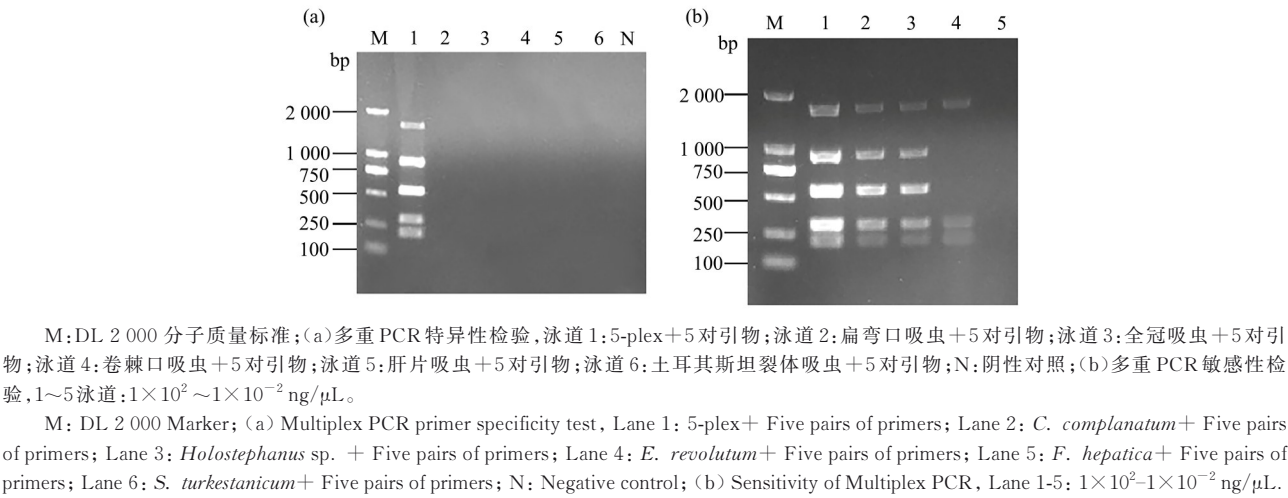


图8 多重PCR的特异性检验和敏感性检验

Fig. 8 Multiplex PCR primer specificity test and sensitivity test

2.8 临床样本检测及验证

使用本研究建立的多重PCR方法对采自于大庆市的100尾麦穗鱼进行检测,结果显示,共有21尾麦穗鱼呈阳性,总感染率为21%。其中8尾为单病原感染,13尾为多病原混合感染;有11尾检出华支睾吸虫(泳道1、2、3、4、5、9、14、15、16、18、20);9尾检出东方次睾吸虫(泳道1、5、6、9、11、14、15、17、20);4尾检出横川后殖吸虫(泳道3、13、15、16);8尾检出日本棘隙吸虫(泳道6、8、9、10、11、15、19、21);8尾检出圆圃棘口吸虫(泳道3、7、8、11、12、16、17、21);所检麦穗鱼最多同时感染华支睾吸虫、东

方次睾吸虫、横川后殖吸虫和日本棘隙吸虫4种病原(泳道15)(图9)。对扩增的阳性结果进行测序,结果显示不同样品扩增的同一病原基因序列与GenBank上相关序列的相似性为99.1%~100%,每种虫体选一条序列上传至GenBank上,华支睾吸虫、东方次睾吸虫、横川后殖吸虫、日本棘隙吸虫和圆圃棘口吸虫5种病原获得的基因登录号分别为PQ821613、PQ821614、PQ821034、PQ824438和PQ821035。同时分别使用形态学鉴定和单重PCR进行检测,结果与本研究建立的多重PCR结果相同。

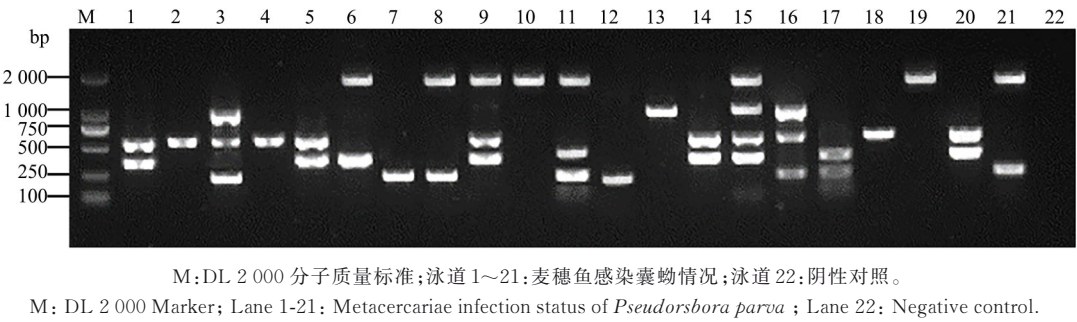


图9 多重PCR的临床样品检测

Fig. 9 Detection of clinical samples by multiplex PCR

3 讨 论

鱼源性人兽共患寄生虫病严重地影响着动物生产和人类健康,本研究中5种吸虫的中间宿主主要为鲤科和鳅科鱼类,且均处于感染性阶段,居民若有生食或半生食等不科学的饮食习惯极易感染这些寄生虫。本研究团队前期对黑龙江省淡水鱼寄生虫感染调查时,发现淡水鱼感染的吸虫囊蚴7种^[11]。因此针对感染率高、感染强度大的华支睾吸虫、东方次睾吸虫、横川后殖吸虫、日本棘隙吸虫和圆圃棘口吸虫囊蚴建立了多重PCR检测方法。

物种的准确鉴定是开展科学研究、疫病治疗与防控等工作的前提与基础。寄生虫传统的形态学鉴定,主要是依据寄生宿主的种类、寄生部位、发育过程以及通过对虫体进行形态观察来完成的。然而,对于寄生于相同宿主、相同部位、相同发育阶段且形态相似的虫体,如吸虫囊蚴的鉴定就非常困难了。但由于不同时期、不同阶段寄生虫DNA相对不变的特点,使得PCR等分子生物学方法成为虫体鉴定的重要方法。线粒体是真核细胞内唯一存在于细胞核外并携带遗传物质的细胞器,核糖体是蛋白质和rRNA分子的组合,翻译mRNA基因以产生蛋白质的细胞器。线粒体和核糖体序列因其稳定的遗传特征,被作为遗传标记基因广泛应用于寄生虫分子分类和鉴定、物种起源与进化、流行病学调查、群体遗传学等研究中。本团队利用线粒体全基因组、*cox1*、*nad1*基因及核糖体ITS和28S序列对土耳其斯坦东毕吸虫进行了分类研究,结果证实土耳其斯坦东毕吸虫应隶属于裂体属,即为土耳其斯坦裂体吸虫,归于非洲血吸虫群^[19-21]。Gao等^[22-23]以线粒体全基因组序列为标记,证实马的三齿属线虫应归于盅口亚科,微小杯冠线虫为复合种的观点。在对肝片吸虫、大片吸虫及中间型进行鉴定时,发现核糖体ITS、18S和28S序列及线粒体*cox1*、*nad4*和*nad5*均为其有效的基因标记^[24-26]。因此,本研究以线粒体*nad5*、*nad1*、*cox1*基因和核糖体18S rDNA序列作为靶序列,来建立了可以同时检测华支睾吸虫、东方次睾吸虫、横川后殖吸虫、日本棘隙吸虫和圆圃棘口吸虫的多重PCR方法。该方法比使用通用引物扩增后测序分析和鉴定更加快捷、节省成本,并且在这些吸虫的流行区域可高效

快速的区分这5种吸虫。

本研究共同退火温度为59和60℃,最终选择59℃是因为华支睾吸虫、东方次睾吸虫、横川后殖吸虫和圆圃棘口吸虫均可以在此温度下成功扩增单一且明亮的条带,而日本棘隙吸虫18S rDNA序列在此温度下的条带最亮,故选择此温度为最终退火温度。这与王丹^[27]在建立奶牛乳房炎5种病原菌多重PCR方法时确定退火温度时的思路一致。本研究表明华支睾吸虫*nad5*基因的最低检出限为 1×10^{-1} ng/μL,东方次睾吸虫*nad1*基因的最低检出限为1 ng/μL,横川后殖吸虫*cox1*的最低检出限为1 ng/μL,日本棘隙吸虫18S rDNA基因的最低检出限为 1×10^{-1} ng/μL,圆圃棘口吸虫*cox1*基因的最低检出限为 1×10^{-1} ng/μL,多重PCR结果显示,最低检出限为1 ng/μL,与单重PCR结果一致。基于以上,本研究建立的多重PCR方法具有较强的敏感性,可最大限度的避免漏检发生。

通过临床样本检验,发现随机采集的100尾麦穗鱼中有21尾感染囊蚴,且混合感染居多。多数样品同时感染2~3种囊蚴,其中1条麦穗鱼最多同时感染4种囊蚴,未发现同时感染5种囊蚴的样品。在检测过程中,为保证检验结果的准确性,在提取样品DNA时需考虑到5种吸虫囊蚴的寄生部位,日本棘隙吸虫囊蚴寄生于鱼鳃中,横川后殖吸虫囊蚴寄生于鱼鳞中,其他3种囊蚴均寄生于肌肉内,因此每份样品均需要剥取鳃丝,在取胸部、腹部和尾部的肌肉时带鱼鳞,以保证试验的准确性。对检测结果使用传统的形态学方法和单重PCR验证,结果一致。本研究建立的多重PCR方法与团队前期建立检测淡水鱼中华支睾吸虫、东方次睾吸虫和日本全冠吸虫的多重PCR检测方法^[16]相比,特异性和敏感性相似,但较之又增加2种病原,更适合于多种病原混合感染的检测。

4 结 论

本研究建立了特异性强、敏感性高的华支睾吸虫、东方次睾吸虫、横川后殖吸虫、日本棘隙吸虫和圆圃棘口吸虫5种人兽共患吸虫囊蚴的多重PCR检测方法,该方法可为鱼类养殖、突发鱼源性公共卫生事件及出入境检验检疫中鱼源性人兽共患吸虫的快速检测提供技术支撑。

参考文献 References

- [1] Qian M B, Chen Y D, Yan F. Time to tackle clonorchiasis in China[J]. *Infectious Diseases of Poverty*, 2013, 2(1): 4
- [2] Chai J Y, Jung B K. General overview of the current status of human foodborne trematodiasis[J]. *Parasitology*, 2022, 149(10): 1262-1285
- [3] Kino H, Suzuki T, Oishi H, Suzuki S, Yamagiwa S, Ishiguro M. Geographical distribution of *Metagonimus yokogawai* and *M. miyatai* in Shizuoka Prefecture, Japan, and their site preferences in the sweetfish, *Plecoglossus altivelis*, and hamsters [J]. *Parasitology International*, 2006, 55(3): 201-206
- [4] 蒋则孝, 许隆祺, 常正山, 杨惠中, 余森海, 罗俊平, 周莉, 徐伏牛, 汤敏, 张秀兰, 苗一龙. 安徽省人体感染横川后殖吸虫3例[J]. 中国人兽共患病杂志, 1988(2): 62-63
Jiang Z X, Xu L Q, Chang Z S, Yang H Z, Yu S H, Luo J P, Zhou L, Xu F N, Tang M, Zhang X L, Miao Y L. Three cases of human infection with *Metagonimus yokogawai* in Anhui Province[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 1988(2): 62-63 (in Chinese)
- [5] 姚立农, 陈琼, 张作忠, 许宝炉, 叶菊莲, 雷昌球. 浙江省首例人体感染横川后殖吸虫的报告[J]. 寄生虫学与寄生虫病杂志, 1991, (S1): 144-145
Yao L N, Chen Q, Zhang Z Z, Xu B L, Ye J L, Lei C Q. First report of human infection with *Metagonimus yokogawai* in Zhejiang Province[J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 1991(S1): 144-145 (in Chinese)
- [6] nHai Y S, Mott K. Epidemiology and morbidity of food-borne intestinal trematode infections[J]. *Tropical Diseases Bulletin*, 1994, 91:125-150
- [7] 林金祥, 高依国, 程由註, 林平, 吴孙珍, 汪涛钦. 人体自然感染日本棘隙吸虫(*Echinochasmus japonicus*)的发现[J]. 福建医药杂志, 1982, 4(2): 30-32,65
Lin J X, Gao Y G, Cheng Y Z, Lin P, Wu S Z, Wang P Q. The discovery of natural human infection with *Echinochasmus japonicus* [J]. *Fujian Medical Journal*, 1982 (2): 30-32,65 (in Chinese)
- [8] 范树奇, 孙明芳. 我国人体首次发现圆圃棘口吸虫病例及虫体形态观察 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 1989, 23(3): 161-163,232
Fan S Q, Sun M F. First report of *Echinostoma hortense* infetion in human in China and morphological observation of the worms[J]. *Journal of Harbin Medical University*, 198923 (3): 161-163,232 (in Chinese)
- [9] 刘晓泉, 石焕焕. 广西圆圃棘口吸虫感染2例报告[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29(1): 77
Liu X Q, Shi H H. Two cases infected by *Echinostoma hortense* in Guangxi [J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2011, 29(1): 77 (in Chinese)
- [10] 庞冲敏, 杨兴林, 缪峰, 翟慧, 刘兰, 韦家秀, 郑智弦. 贵州省圆圃棘口吸虫感染1例[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2019, 37(5):500
Pang C M, Yang X L, Miao F, Zhai H, Liu L, Wei J X, Zheng Z X. A case of *Echinostoma hortense* infection in Guizhou province[J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2019, 37(5):500 (in Chinese)
- [11] 王春仁, 高俊峰, 张莹. 淡水动物寄生虫感染与人兽共患病[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2024
Wang C R, Gao J F, Zhang Y. *Parasitic Infection of Freshwater Animal and Zoonosis* [M]. Harbin: Northeast Forestry University, 2024 (in Chinese)
- [12] 邱鸿宇, 兰卓, 果馨儒, 吴婷婷, 姜岩, 金程佳, 张晓轩, 王春仁. 犬体内两种人兽共患棘口吸虫的分子鉴定[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2020, 32(6): 43-47,69
Qiu H Y, Lan Z, Guo X R, Wu T T, Jiang Y, Jin C J, Zhang X X, Wang C R. Molecular identification of two species of zoonotic echinostomatid trematodes in dog [J]. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University*, 2020, 32(6): 43-47,69 (in Chinese)
- [13] Gaye P M, Doucouré S, Sow D, Sokhna C, Ranque S. Identification of *Bulinus forskalii* as a potential intermediate host of *Schistosoma haematobium* in Senegal[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2023, 17 (5): e0010584
- [14] Tantrawatpan C, Saijuntha W. Multiplex PCR development for the differential detection of four medically important echinostomes (Trematoda: *Echinostomatidae*) in Thailand [J]. *Acta Tropica*, 2020, 204: 105304
- [15] 高俊峰, 王鑫, 毛瑞锋, 孙云异, 王春仁, 黄翠琴. 淡水鱼中3种吸虫囊蚴多重PCR检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(2): 157-161
Gao J F, Wang X, Mao R F, Sun Y Y, Wang C R, Huang C Q. Establishment of multiplex PCR for detection of three kinds of Trematode metacercariae in freshwater fish [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2022, 44(2): 157-161 (in Chinese)
- [16] 梅雪芳, 李树清, 康羊群, 石云良, 黄腾飞, 陈志飞, 黄维义. 横川后殖吸虫与扇棘单辜吸虫双重PCR鉴别方法的建立[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2015, 33(3): 176-180
Mei X F, Li S Q, Kang Y Q, Shi Y L, Huang T F, Chen Z F, Huang W Y. Establishment of duplex PCR for identifying *Metagonimus yokogawai* and *Haplorchis taichui*[J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2015, 33(3): 176-180 (in Chinese)
- [17] 张莹. 黑龙江省主要淡水鱼吸虫囊蚴感染情况调查与分析[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2015
Zhang Y. Prevalence analysis of trematodes metacercariae in main freshwater fishes in Heilongjiang Province. [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [18] Li M H, Huang H I, Chen P L, Huang C H, Chen Y H, Ooi H K. *Metagonimus yokogawai*: Metacercariae survey in fishes and its development to adult worms in various rodents [J]. *Parasitology research*, 2013, 112(4): 1647-1653
- [19] Wang C R, Li L, Ni H B, Zhai Y Q, Chen A H, Chen J, Zhu X Q. *Orientobilharzia turkestanicum* is a member of *Schistosoma* genus based on phylogenetic analysis using ribosomal DNA sequences [J]. *Experimental Parasitology*, 2009, 121(2): 193-197
- [20] Li L, Yu L Y, Zhu X Q, Wang C R, Zhai Y Q, Zhao J P. *Orientobilharzia turkestanicum* is grouped within African schistosomes based on phylogenetic analyses using sequences of mitochondrial genes [J]. *Parasitology Research*, 2008, 102(5): 939-943
- [21] Wang Y, Wang C R, Zhao G H, Gao J F, Li M W, Zhu X Q. The complete mitochondrial genome of *Orientobilharzia turkestanicum* supports its affinity with African *Schistosoma* spp[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2011, 11(8): 1964-1970
- [22] Gao Y, Zhang Y, Yang X, Qiu J H, Duan H, Xu W W, Chang Q C, Wang C R. Mitochondrial DNA evidence supports the hypothesis that *Triodontophorus* species belong to Cyathostominae [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1444
- [23] Gao Y, Qiu Y Y, Meng X Q, Yang X, Zhang Z H, Diao Z Y, Wang S, Wang C R, Song M X. Comparative analysis of mitochondrial DNA datasets indicates that *Cylicostephanus minutus* represents a species complex[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2020, 84: 104487
- [24] Lin R Q, Dong S J, Nie K, Wang C R, Song H Q, Li A X, Huang W Y, Zhu X Q. Sequence analysis of the first internal transcribed spacer of rDNA supports the existence of the intermediate *Fasciola* between *F*

- hepatica* and *F. gigantica* in mainland China[J]. *Parasitology Research*, 2007, 101(3): 813-817
- [25] Ai L, Weng Y B, Elsheikha H M, Zhao G H, Alasaad S, Chen J X, Li J, Li H L, Wang C R, Chen M X, Lin R Q, Zhu X Q. Genetic diversity and relatedness of *Fasciola* spp isolates from different hosts and geographic regions revealed by analysis of mitochondrial DNA sequences [J]. *Veterinary Parasitology*, 2011, 181(2/4): 329-334
- [26] Zeng M H, Wang X X, Lan Z, Guo X R, Jiang Y, Wu T T, Chang Q C, Wang C R. Identification of new polymorphic positions in rDNA sequences of the “intermediate” *Fasciola* forms [J]. *Parasitology International*, 2022, 88: 102555
- [27] 王丹. 奶牛乳房炎主要病原菌多重PCR诊断方法的建立与应用[D]. 北京:中国农业科学院, 2018
- Wang D. Establishment and applicaion of multiplex PCR dignostic method for main pathogens of bovine mastitis [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018 (in Chinese)
- 责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 王雪,女,黑龙江佳木斯人,在读硕士研究生,主要从事分子寄生虫学与动物寄生虫病防治的研究。多次参与学术会议,如中国畜牧兽医学会兽医寄生虫学分会第18次学术研讨会、中国动物学会寄生虫学专业委员会第十九次全国学术会议等,多次参与社区志愿者活动。



通讯作者简介: 王春仁,博士研究生,二级教授,博士研究生导师,黑龙江省教学名师,享受国务院政府特殊津贴专家。现为中国畜牧兽医学会兽医寄生虫学分会常务理事、黑龙江省畜牧兽医学会家畜寄生虫学分会荣誉副理事长。主要从事动物寄生虫病及重要人兽共患病研究工作,先后主持国家自然科学基金、黑龙江省自然科学基金重点项目等各类科研项目20多项,主持项目“牛重要疫病防控关键技术研究与应用”获黑龙江省科技进步一等奖;在 *Veterinary Parasitology*、*Parasites & Vectors* 和《中国兽医科学》等学术期刊发表科研论文200多篇,其中第一或通讯作者发表SCI收录论文70多篇,出版学术专著3部,授权发明专利3项,软件著作权1项。