

基于线粒体 ND6 基因检测犬感染细粒棘球 绦虫的粪便 PCR 方法

詹佳飞¹, 宋宏宇¹, 王 凝^{1,2}, 郭 承¹, 李春燕¹, 谢 跃¹, 古小彬¹, 杨光友¹

摘要:目的 旨在了解动物包虫病流行区内犬细粒棘球绦虫的感染情况。方法 本研究利用 Qiagen DNeasy Powersoil 试剂盒对犬粪提取 DNA, 并从细粒棘球绦虫线粒体全基因组中筛选出完整线粒体 ND6 基因作为靶基因, 建立一种可对犬粪中细粒棘球绦虫同时进行检测及基因分型的 PCR 方法。结果 该法特异性很高, 仅能扩增出细粒棘球绦虫的目的条带而对照组均无条带扩增。其灵敏度达到 4 pg 的 DNA 含量。当犬人工感染约 50 000 只原头蚴时, 该法最早可以扩增出感染第 13 d 粪便中的 ND6 目的基因。同时, 对 40 份随机采自包虫病流行区的待检犬粪进行 PCR 检测, 共有 6 份样品可扩增出目的条带且其基因型均属 G1 型, 其检测及分型结果均与经典基因分型依据(COX1 基因片段)的结果一致。结论 本研究建立的粪便 PCR 方法具有很高的特异性和灵敏度, 并可用于检测犬的细粒棘球绦虫早期感染情况。对于 PCR 检测阳性者, 其产物经测序分析后也可用于细粒棘球绦虫的基因分型及种群遗传结构的分析研究。

关键词:犬; 细粒棘球绦虫; 线粒体 ND6 基因; PCR 检测; 基因分型

中图分类号: S852.734

文章标识码: A

文章编号: 1002-2694(2019)07-0626-07

Detection of *Echinococcus granulosus* infection in dogs on the mitochondrial ND6 gene by Copro-PCR assay

ZHAN Jia-fei¹, SONG Hong-yu¹, WANG Ning^{1,2}, GUO Cheng¹,
LI Chun-yan¹, XIE Yue¹, GU Xiao-bin¹, YANG Guang-you¹

(1.College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2.College of Bioengineering, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin 644000, China)

Abstract: In order to evaluate the infection of *Echinococcus granulosus* in dogs in the echinococcosis epidemic areas, we extracted DNA from canine faeces using the Qiagen DNeasy Powersoil kit and screened the whole mitochondrial ND6 gene as a target gene from the complete mitochondrial genomes of *E.granulosus* for detection and genotyping of *E.granulosus*. The results showed that the specificity of the PCR assay was very high, only the *E.granulosus* could be successfully amplified. And the analytical sensitivity was 4 pg of DNA. Moreover, the assay could amplify the target gene in faeces of the 13th day as early as possible when the dogs were infected with about 50 000 protozoa. In addition, in 40 faeces which were from echinococcosis epidemic areas, 6 samples provided specific DNA fragments using the Copro-PCR assay. The sequence data showed that 6 samples were identified as G1 genotype, which were the same as the sequencing results and the nucleotide sequence analysis of the part of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 (COX1) gene—a good candidate in the genotyping of *E.granulosus*. The Copro-PCR assay developed in this study has high specificity and sensitivity and could be used to detect *E.granulosus* latent infection in dogs. In addition, the PCR-positive production also could be used for genotyping and population genetic structure analysis of *E.granulosus* via the nucleotide sequence analysis.

Keywords: dogs; *Echinococcus granulosus*; NADH dehydrogenase subunit 6; PCR detection; genotyping

国家自然科学基金项目(No.31672547);四川省科技支撑计划项目(No.2015NZ0041)联合资助

通讯作者: 杨光友, Email: guangyou1963@aliyun.com;

ORCID: 0000-0003-3177-0908

作者单位: 1. 四川农业大学动物医学院, 成都 611130;

2. 四川理工学院生物工程学院, 宜宾 644000

Supported by the National Natural Science Foundation of China [grant number 31672547] and the Key Technology R&D Program of Sichuan Province, China [grant number 2015NZ0041].

Correspondence author: Yang Guang-you, Email: guangyou1963@aliyun.com

细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*, Eg)的生活史较为复杂,要通过中间宿主—某些家畜(如牛、羊等食草动物)和终末宿主犬科动物来共同完成,其中细粒棘球绦虫的中绦期幼虫—细粒棘球蚴主要寄生在中间宿主的肝脏和肺脏内,从而引起细粒棘球蚴病(囊型包虫病)(Echinococcosis)^[1-2]。该病为一种人兽共患寄生虫病,呈世界性分布,其中我国属高发地区之一,目前至少有 368 个流行县^[3],主要流行于青海、新疆、西藏、四川西北部牧区以及宁夏。现该病已被列为我国《国家中长期动物疫病防治规划》(2012—2020)年优先防治和重点防范的动物疫病^[4]。

犬是细粒棘球绦虫最重要的终末宿主和传染源。犬吞食棘球蚴后,原头蚴在其小肠内经 40~50 d 便可发育为成虫,成虫在犬体内的寿命为 5~6 个月。成虫孕节及虫卵随犬粪排出并污染食料、水源及环境,中间宿主经口食入虫卵而受到感染,从而引起囊型包虫病^[5]。如能及时准确地掌握犬感染细粒棘球绦虫的情况,对人和动物包虫病的防控均具有重要意义。

随着分子生物学技术的发展,线粒体 DNA(mtDNA)基因已被广泛应用为生物分子诊断标记及分子遗传标记^[6-9]。线粒体 ND6 基因(ND6)全序列长度相对较短,结构简单无内含子,进化速率适中,序列变异丰富,突变率显著高于核 DNA,目前已被广泛应用于牦牛、鱼类及昆虫的种群遗传结构分析^[10-13]。本研究选择细粒棘球绦虫的 ND6 基因作为分子标记,进行了犬粪中细粒棘球绦虫 DNA 的分子检测及基因分型研究。

1 材料与方法

1.1 样品收集 细粒棘球绦虫(18 日龄童虫虫体)、孟氏迭宫绦虫(*Spirometra mansoni*)、豆状带绦虫(*Taenia pisiformis*)、犬复孔绦虫(*Dipylidium caninum*)、多头带绦虫(*Taenia multiceps*)、泡状带绦虫(*Taenia hydatigena*)及犬弓首蛔虫(*Toxocara canis*)样品 DNA 由四川农业大学动物寄生虫病研究中心提供;多房棘球绦虫(*Echinococcus multilocularis*)样品 DNA 由中国 CDC 上海寄生虫病研究所党志胜博士惠赠。

1.2 粪样收集 对 2 只家犬(1 号犬、2 号犬)进行药物驱虫后,每只饲喂约 50 000 条的原头蚴。感染第 3 d 到 18 d,每天分别收集 2 只犬的粪便;40 份待检临床犬粪随机采自四川省甘孜州包虫病流行区,由甘孜州动物疫病预防控制中心采集并提供;豆状

带绦虫(5 份)、多头带绦虫(5 份)及泡状带绦虫(2 份)的犬粪由四川农业大学动物寄生虫病研究中心提供。将以上所有粪样均置于-80 ℃ 2 周以上进行无害化处理。

1.3 方法

1.3.1 提取粪便 DNA 按照 Qiagen DNeasy Power-soil 试剂盒(Qiagen, Carlsbad, CA)说明书提取犬粪便 DNA。

1)将 60 μ L Solution C1 加入到 PowerBead Tubes 中混匀;2)再次加入约 0.25 mg 的犬粪样品到 PowerBead Tubes 后轻轻涡旋混匀;3)把 PowerBead Tubes 固定在涡旋仪适配器上,3 200 r/min 涡旋连续振荡 10~20 min;4)室温下 10 000 g 离心 PowerBead Tubes 30 s,转移上清至一个干净的 2 mL Collection Tube 中;5)加入 250 μ L Solution C2 到上清中,涡旋混匀 5 s,4 ℃ 孵育 5 min;6)室温 10 000 g 离心 Collection Tube 1 min,转移上清 \leq 600 μ L 到一个新的收集管中;7)加入 200 μ L Solution C3 到上清中,涡旋混匀,4 ℃ 孵育 5 min;8)室温 10 000 g 离心 Collection Tube 1 min,转移上清 \leq 750 μ L 到一个新的收集管中;9)加入 1 200 mL 摇匀的 Solution C4 到上清中,涡旋混匀 5 s;10)加载约 675 μ L 上清到 Spin Filter 中,室温 10 000 g 离心 1 min,弃去滤液;11)重复 9)直至过滤完所有上清;12)加入 500 μ L Solution C5 到 MB Spin Filter 中,室温 10 000 g 离心 30 s,弃去上清;13)室温 10 000 g 离心 MB Spin Filter 1 min,并小心转移 MB Spin filter 到 2 mL Collection Tube 中,尽量避免 Solution C5 污染;14)加入 100 μ L Solution C6 到白色滤膜中心,室温 10 000 g 离心 30 s;15)弃去 Spin Filter。此时收集管中的 DNA 可立即进行 PCR 的使用或者储存于-20 ℃ 备用。

1.3.2 引物设计 对 GenBank(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中细粒棘球绦虫 G1-G10 型线粒体全基因组序列进行比对,筛选出可扩增 ND6 全基因的保守区域以设计合适的引物。上游引物 A1: 5'-TTTCGTGCTGTAGATGGT-3',下游引物 A2: 5'-CACAGATTTCAAAGGGT-3',扩增片段为 558 bp。COX1 基因片段序列(366 bp)扩增引物,参考相关文献^[14]进行设计。上游引物 JB3: 5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3',下游引物 JB4: 5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3'。2 对引物序列均由生物生工工程(上海)股份有限公司合成。

1.3.3 ND6 基因的 PCR 扩增 扩增体系为 25 μ L:

2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL, 引物 A1、A2 各 1.0 μL, 模板 DNA 1.0 μL, ddH₂O 8.7 μL, 0.4% BSA 0.8 μL (BSA 为稳定剂), 轻轻混匀后瞬时离心 15 s, 同时, 以 ddH₂O 代替模板 DNA 作空白对照。扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 58.5℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 6 min。反应结束后取 10 μL 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。平行试验重复 3 次。

1.3.4 测序鉴定 使用胶回收试剂盒收集 PCR 阳性产物纯化, 产物直接送生物系统工程(上海)股份有限公司测序, 应用 DNAMAN 软件对测序序列和参照序列进行多重比较和相似性分析。

1.3.5 ND6 基因的特异性测定 在相同条件下对多房棘球绦虫、孟氏迭宫绦虫、豆状带绦虫、犬复孔绦虫、多头带绦虫、泡状带绦虫及犬弓首蛔虫的 ND6 基因进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖电泳检测结果。

1.3.6 ND6 基因的灵敏度测定 利用 Thermo Scientific NanoDrop 分光光度计 (Thermo, New York, USA) 测定细粒棘球绦虫模板 DNA 的初始浓度, 之后将提取出的模板 DNA 按 1:10、1:100、1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000、1:64 000、1:128 000 倍比稀释, 并在相同条件下进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖电泳检测结果。

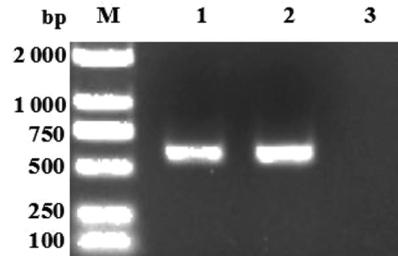
1.3.7 人工感染细粒棘球绦虫犬粪样的 ND6 基因检测 对 2 只犬(1 号犬、2 号犬)人工感染原头蚴第 3 d 至第 18 d 后的粪便依次进行 DNA 提取, 并利用 PCR 扩增 ND6 基因, 1% 琼脂糖电泳检测结果。

1.3.8 ND6 基因与 COX1 基因作为分子标记的犬粪样临床检测比较 对 40 份随机采自包虫病流行区的待检犬粪进行 DNA 提取, 并对 ND6 完整基因序列进行 PCR 扩增, 同时扩增 COX1 部分基因序列, 1% 琼脂糖电泳检测结果。对 PCR 结果呈阳性的样品使用柱式 DNA 胶回收试剂盒进行 DNA 的回收纯化, 回收产物进行双向测序, 以保证所测序列的准确性。将 ND6 和 COX1 测序后的基因序列与 GenBank 检索的 10 个基因型的线粒体 DNA 序列相应区域做同源性比较, 鉴定样品基因型。另外, 对 5 份自然感染豆状带绦虫的犬粪、5 份自然感染的多头带绦虫犬粪及 2 份自然感染的泡状带绦虫犬粪样品扩增 ND6 基因, 1% 琼脂糖电泳检测结果。

2 结果

2.1 细粒棘球绦虫 18 d 龄童虫 ND6 基因的 PCR

扩增 用合成的引物 A1、A2, 对从实验室人工感染犬的肠道获得的细粒棘球绦虫虫体(18 日龄童虫)提取 DNA 并扩增出了完整的 ND6 基因, 条带大小与预期结果相符合, 且条带清晰。阴性对照无任何条带(图 1)。



M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: 虫体 DNA; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照

图 1 细粒棘球绦虫虫体 ND6 基因的 PCR 扩增

Fig.1 ND6 PCR amplification from DNA samples obtained from the *E.granulosus*

2.2 ND6 基因的特异性测定 细粒棘球绦虫 DNA 样品 PCR 扩增反应产生单一目的条带, 而多房棘球绦虫、孟氏迭宫绦虫、豆状带绦虫、犬复孔绦虫、多头带绦虫、泡状带绦虫及犬弓首蛔虫的 DNA 样本和阴性对照均无此扩增条带(图 2)。



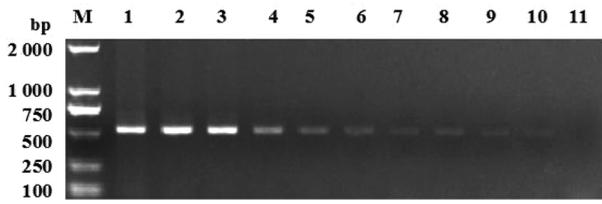
M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: 细粒棘球绦虫 DNA; 2: 多房棘球绦虫 DNA; 3: 多头带绦虫 DNA; 4: 孟氏迭宫绦虫 DNA; 5: 豆状带绦虫 DNA; 6: 泡状带绦虫 DNA; 7: 犬复孔绦虫 DNA; 8: 犬弓首蛔虫 DNA; 9: 阴性对照

图 2 ND6 基因的特异性测定

Fig.2 Specificity test of the ND6 gene

2.3 ND6 基因的灵敏度测定 经测定, 细粒棘球绦虫模板初始 DNA 含量为 273 ng, 随着稀释度的增加, 模板中 DNA 的含量越来越低, 且电泳条带亮度在逐渐减弱, 在稀释度为 1/64 000 即(4 pg) 时能扩增到一条很淡的条带, 但在稀释度为 1/128 000 (即 2 pg) 时无条带扩增出(图 3)。

2.4 人工感染细粒棘球绦虫犬粪样的 ND6 基因检测 经测定, 在感染细粒棘球绦虫第 3 d 至 11 d 时, 2 只犬粪便的 ND6 基因 PCR 扩增结果均为阴性。



M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: 1; 2: 1/10; 3: 1/100; 4: 1/1 000; 5: 1/2 000; 6: 1/4 000; 7: 1/8 000; 8: 1/16 000; 9: 1/32 000; 10: 1/64 000; 11: 1/128 000

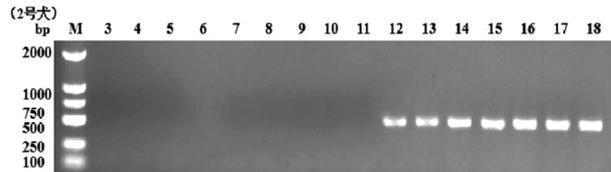
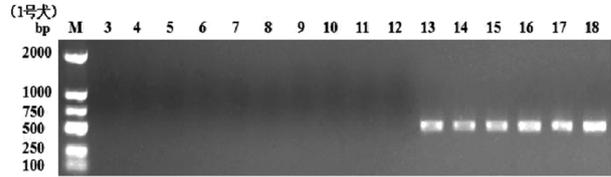
图 3 ND6 基因的灵敏度测定

Fig.3 Sensitivity test of the ND6 gene

在第 12 d 时,只有 2 号犬的 ND6 基因 PCR 结果为阳性,而感染第 13 d 至 18 d 时,两只犬 ND6 基因 PCR 结果均出现阳性目的条带(图 4)。

2.5 ND6 基因与 COX1 基因作为分子标记的犬粪样临床检测比较 对 40 份临床犬粪进行 PCR 检测后,有 6 份犬粪样品为 PCR 阳性,且 ND6 基因及 COX1 基因的检测及分型结果均相同,即 6 份样品均属 G1 基因型。而对 5 份自然感染豆状带绦虫的

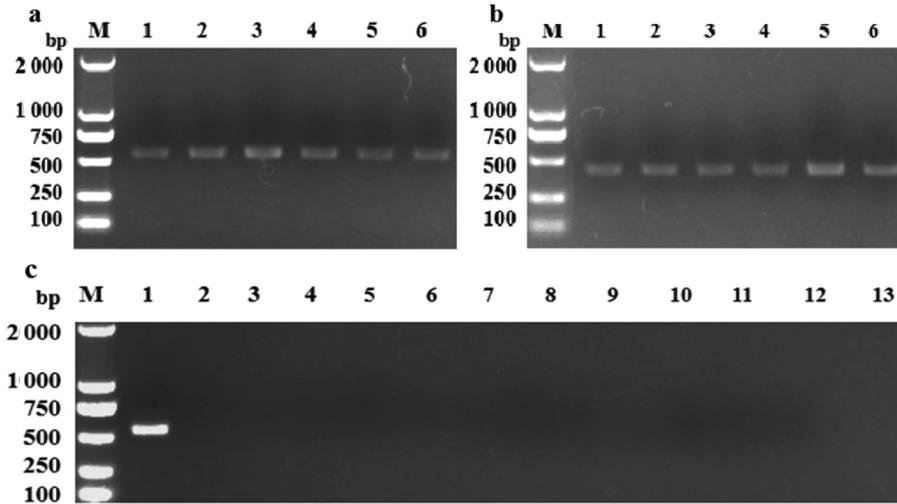
犬粪、5 份自然感染的多头带绦虫犬粪及 2 份自然感染的泡状带绦虫犬粪进行 PCR 检测扩增 ND6 基因时,无样品呈现扩增性条带(图 5a-5c)。



M: DL2000 DNA 分子量标准; 3-18: 人工感染第 3 d 至第 18 d 的犬粪 DNA

图 4 1 号犬与 2 号犬粪便样品的 ND6 基因检测

Fig.4 PCR amplification of ND6 gene in faeces samples of No. 1 dog and No. 2 dog



M: DL2000 DNA 分子量标准; 1-6: 阳性犬粪 DNA

图 5a 6 份阳性犬粪 DNA 的 ND6 基因检测

Fig.5a ND6 PCR amplification of 6 positive canine faeces DNA

M: DL2000 DNA 分子量标准; 1-6: 阳性犬粪 DNA

图 5b 6 份阳性犬粪 DNA 的 COX1 基因检测

Fig.5b COX1 PCR amplification of 6 positive canine faeces DNA

M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: 阳性对照; 2-6: 豆状带绦虫犬粪 DNA; 7-11: 多头带绦虫犬粪 DNA; 12-13: 泡状带绦虫犬粪 DNA

图 5c 对照组临床犬粪的 ND6 基因检测

Fig.5c ND6 gene's amplifying results of the control group of clinical canine faeces by PCR

3 讨论

检测犬感染细粒棘球绦虫的传统经典方法主要

有:剖检法、槟榔碱泻下法和虫卵漂浮检查法。但是这些方法费时费力、易漏检、且生物危害性较大^[15]。

粪抗原 ELISA 检测法简单易行,特异性可高达 97%^[16-17]。但其敏感性易受感染程度的影响,当感染虫体数在 100 条以下时,其敏感性只有 29%^[18-20]。此外,该法在带科绦虫种属相近的虫体之间可能会出现严重的交叉反应^[21],因此,粪抗原 ELISA 法检测结果可能出现较高的假阳性。LAMP 技术所需设备简单,反应快速,产物检测便捷,特异性强^[22-25],且 Bst DNA 聚合酶的活性几乎不受粪便抑制物的影响^[24-26]。但因其灵敏度过高,少量的基因污染就会导致该法实验结果呈假阳性^[27];且由于 LAMP 法的电泳图为多条带,故不易辨认非特异性扩增的产生^[28],也无法通过基因测序而进行基因分型分析。另外,该法要求靶序列长度控制在 300 bp 以下,对引物要求较高,要筛选出合适的引物需要耗费大量的工作^[29]。

动物粪便易于收集保存且粪便中感染源的数量庞大,其病原体遗传物质可以来源于寄生虫的虫卵,或寄生虫虫体的细胞及组织碎片等,仅用少量的粪便即可提取到目的基因^[30],因此粪便 PCR 检测法也逐渐成为了检测动物疾病的重要途径。相比于病原学检测和免疫学检测方法,PCR 检测方法具有快速、准确、敏感、特异等优点,也可实现对形态难以区分的带科绦虫的鉴定^[31-32]。自 Bretagne 等^[33]报道用 PCR 技术从狐狸粪 DNA 中检测多房棘球绦虫感染之后,该技术在犬粪棘球绦虫卵检测中也得到广泛的应用。Dinkel 等^[16]应用巢式 PCR 检测法对多房棘球绦虫 12S rRNA 片段(373 bp)进行了扩增,结果最低检测到 1 个虫卵,而细粒棘球绦虫等 11 种其他绦虫均无非特异性扩增,特异性为 100%。Abbasi 等^[34]对目标重复序列(EgG1 Hae III)(133 bp)进行了 PCR 扩增,其敏感度很高,最低也可检测出一个虫卵。但其特异性较差,同时扩增的水泡带绦虫、多头带绦虫、羊带绦虫也具有相同的 133 bp DNA 重复序列^[35]。Stefania 等^[36]对细粒棘球绦虫 G1 株的 12S rDNA 片段(255 bp)进行 PCR 扩增,敏感性达到对一个虫卵的检测,同时对细粒棘球绦虫另外 5 种基因型和其它 14 种绦虫基因进行扩增,结果仅特异性的扩增出细粒棘球绦虫 G1 型,检测结果无假阳性。此外,Dinkel 等^[37]还根据细粒棘球绦虫 G1 株线粒体 12S rRNA 基因序列(254 bp)设计引物,鉴别了绦虫不同属和细粒棘球绦虫不同基因型(共 16 种),其特异性达 100%,同时其敏感度也达到 0.25 pg 的 DNA 含量。但是,以上 PCR 检测的研究中,所选用的靶基因均为较短片段,所包含的遗传信息有限,不宜作为分子遗传标记。

本研究中,我们首次建立了一种粪便 PCR 方法,可同时对细粒棘球绦虫进行检测及基因分型研究。在我国,犬小肠内寄生的绦虫除细粒棘球绦虫外,最常见的还有多房棘球绦虫、多头带绦虫、泡状带绦虫、豆状带绦虫、犬复孔绦虫、孟氏迭宫绦虫。另外,犬弓首蛔虫也是很常见的犬肠道寄生虫。本实验分别对以上 8 种寄生虫进行了 PCR 检测,结果表明除细粒棘球绦虫外均未扩增出目的条带,说明本方法设计的引物具有高度的种特异性,不会发生交叉反应。而在测定本方法的灵敏度时,将目的基因按比例稀释(273 ng~2 pg),结果表明随着 DNA 浓度的逐渐降低,目的条带亮度也在逐渐减弱直到稀释至 4 pg 后阳性条带才完全消失,这就表明该方法具有较高的灵敏度。Alsabi 等^[38]曾采用虫卵漂浮法、粪抗原 ELISA 法、粪便 PCR 法及虫卵 PCR 法对感染多房棘球绦虫的不同时期进行检测,最终认为在潜伏期(感染 2 d~29 d)时,粪抗原 ELISA 检测法最敏感,远高于粪便 PCR 法的敏感性。但是在本研究中,当犬人工感染约 50 000 只原头蚴时,建立的粪便 PCR 法在感染后第 13 d 便可从犬粪中扩增出目的基因,表明该法能够在早期诊断出犬细粒棘球绦虫的感染情况,适用于在细粒棘球绦虫感染潜伏期进行诊断。

目前,根据 mtDNA 基因的不同^[14, 39-44],可将细粒棘球绦虫分为 10 个不同的地理株(G1~G10),其中线粒体基因 COX1(366 bp)基因片段是经典常用的基因分型方法之一。本研究中,我们利用 ND6 基因对自然感染细粒棘球绦虫的阳性犬粪进行了基因分型,其分型结果与 COX1 基因的结果完全一致,均为 G1 型。结果表明我们所扩增的 ND6 全基因序列,不仅可以作为分子诊断标记进行 PCR 检测,而且其还可作为分子遗传标记,对细粒棘球绦虫进行进一步的基因分型及种群遗传结构分析。

粪便 PCR 检测法虽有大量的优点,但粪便中较多干扰因素的存在使目的基因的提取难度相对增大^[45],同时也使 PCR 检测结果受到很大影响。据报道用 0.4%~0.6%(wt/vol)的 BSA 可提高 Taq 聚合酶的活性,降低粪便抑制剂的作用,增强 PCR 扩增的敏感性,因此我们在 PCR 体系中加入 0.4% BSA,明显地提高了 PCR 反应结果质量^[46]。

4 结论

本试验成功建立了一种基于线粒体 ND6 基因检测犬感染细粒棘球绦虫的粪便 PCR 方法,具有很高的特异性和灵敏度,并能够在感染早期及时检测

出犬粪便中的细粒棘球绦虫,可用于犬感染细粒棘球绦虫的流行病学调查。同时,对于 PCR 检测阳性者,其胶回收产物经测序分析后也可用于细粒棘球绦虫基因分型及种群遗传结构的分析研究。

利益冲突:无

引用本文格式:詹佳飞,宋宏宇,王凝,等.基于线粒体 ND6 基因检测犬感染细粒棘球绦虫的粪便 PCR 方法[J]. 中国人兽共患病学报,2019,35(7):626-632. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.67

参考文献:

- [1] Craig PS, Hegglin D, Lightowlers MW, et al. Echinococcosis: control and prevention[J]. *Adv Parasitol*, 2017, 96:155-158. DOI:10.1016/bs.apar.2016.09.002
- [2] Taxy JB, Gibson WE, Kaufman MW. Echinococcosis: unexpected occurrence and the diagnostic contribution of routine histopathology[J]. *Am J Surg Pathol*, 2017, 41(1):94-100. DOI:10.1097/PAS.0000000000000742
- [3] Qian MB, Abela-Ridder B, Wu WP, et al. Combating echinococcosis in China: strengthening the research and development [J]. *Infect Dis Poverty*, 2017, 6(1):161. DOI:10.1186/s40249-017-0374-3
- [4] 宋星桔,胡丹丹,杨光友. 动物棘球蚴病防控面临的问题与挑战 [J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(3):264-271. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2015.03.017
- [5] Singh BB, Sharma R, Sharma JK, et al. Molecular detection of *E. granulosus* sheep strain (G1) infections in naturally infected dogs in Punjab (India)[J]. *Helminthologia*, 2014, 51(4):269-272. DOI:10.2478/s11687-014-0240-9
- [6] 郭秀霞,程鹏,刘丽娟,等. 基于 mtDNA-CO I 基因的山东省蚊种群遗传多样性分析[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2018(1):37-41. DOI:10.16250/j.32.1374.2017091
- [7] Makkonen J, Jussila J, Panteleit J, et al. MtDNA allows the sensitive detection and haplotyping of the crayfish plague disease agent *Aphanomyces astaci* showing clues about its origin and migration [J]. *Parasitology*, 2018, 145(9): 1-9. DOI: 10.1017/S0031182018000227
- [8] Senoo T, Yamanaka M, Nakamura A, et al. Quantitative PCR for detection of DNA damage in mitochondrial DNA of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *J Microbiol Meth*, 2016, 127:77-81. DOI:10.1016/j.mimet.2016.05.023
- [9] 徐丹丹,黄燕,曾庆,等. 基于 mtDNACytb 基因序列的我国不同水系野生鲇种群遗传多样性与种群历史分析[J]. 水产学报, 2017, 41(10): 1489-1499. DOI: 10.11964/jfc.20161010572
- [10] Bai J, Xu S, Nie Z, et al. The complete mitochondrial genome of *Huananpotamon lichuanense* (Decapoda: Brachyura) with phylogenetic implications for freshwater crabs [J]. *Gene*, 2018, 646:217-226. DOI: 10.1016/j.gene.2018.01.015
- [11] 沈莹,左成学,吴敏,等. 赤眼鳟线粒体 NADH 脱氢酶 6 基因克隆及序列特征分析[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(1):85-87. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2010.01.032
- [12] Silva-Brandão KL, Lyra ML, Santos TV, et al. Exploitation of mitochondrial nad6 as a complementary marker for studying population variability in *Lepidoptera* [J]. *Genet Mol Biol*, 2011, 34(4):719-725. DOI:10.1590/S1415-47572011000400028
- [13] 海汀,柴志欣,张成福,等. 西藏牦牛 mtDNA ND6 遗传多样性及系统进化分析[J]. 家畜生态学报, 2014, 35(11):11-17. DOI:10.3969/j.issn.1673-1182.2014.11.003
- [14] Bowles J, Blair D, Mcmanus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, 54(2):165-173. DOI:10.1016/0166-6851(92)90109-W
- [15] 陈洁,马海梅,古力帕丽,等. 用 EgAgB8/3 重组蛋白 ELISA-双抗夹心法建立棘球绦虫感染犬粪抗原检测系统的研究[J]. 新疆医科大学学报, 2011, 34(3):240-245. DOI:10.3969/j.issn.1009-5551.2011.03.003
- [16] Dinkel A, Nickischrosenegk MV, Bilger B, et al. Detection of *Echinococcus multilocularis* in the Definitive Host: Coprodiagnosis by PCR as an Alternative to Necropsy[J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(7):1871. DOI:mdl-9650927
- [17] Deplazes P, Gottstein B, Eckert J, et al. Detection of *Echinococcus* coproantigens by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs, dingoes and foxes[J]. *Parasitol Res*, 1992, 78(4):303. DOI:10.1007/BF00937088
- [18] 张旭,古努尔,吐尔逊,等. 犬细粒棘球绦虫粪抗原夹心 ELISA 检测方法的建立 [J]. 动物医学进展, 2012, 33(3):19-23. DOI:10.3969/j.issn.1007-5038.2012.03.005
- [19] 焦伟,柴君杰,伊斯拉音,等. 粪抗原检测法诊断犬细粒棘球绦虫感染的研究 II. 粪抗原检测的敏感性、特异性及实验感染犬排出粪抗原的动态观察[J]. 中国人兽共患病学报, 1999, 27(4):41-44. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.1999.04.012
- [20] Deplazes P, Alther P, Tanner I, et al. *Echinococcus multilocularis* coproantigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay in fox, dog, and cat populations[J]. *J Parasitol*, 1999, 85(1):115-121. DOI:10.2307/3285713
- [21] 陈家旭,常正山. ELISA 检测粪抗原诊断寄生虫感染的研究进展[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2006, 33(6):296-300. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2006.06.004
- [22] Nkouawa A, Sako Y, Li T, et al. A loop-mediated isothermal amplification method for a differential identification of *Taenia tapeworms* from human; application to a field survey[J]. *Parasitol Int*, 2012, 61(4):723-725. DOI:10.1016/j.parint.2012.06.001
- [23] Ni X, Mcmanus DP, Yan H, et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for the identification of *Echinococcus multilocularis* infections in canine definitive hosts[J]. *Parasite Vector*, 2014, 7(1):254. DOI:10.1186/1756-3305-7-254
- [24] Li Y, Fan P, Zhou S, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 107: 54. DOI:10.1016/j.micpath.2017.03.016
- [25] 吴禹熹,李璞君,王娟,等. LAMP 方法及其在病原微生物检

- 测中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(2): 389-393. DOI: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2016.02.015
- [26] Ni XW, Mcmanus DP, Lou ZZ, et al. A Comparison of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) with other surveillance tools for *Echinococcus granulosus* diagnosis in canine definitive hosts[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e100877. DOI: 10.1371/journal.pone.0100877
- [27] 何琳, 徐海圣, 王美珍, 等. 白斑综合征病毒环介导等温扩增快速检测方法的建立[J]. 水产学报, 2010, 34(4): 598-603. DOI: 10.3724/SP.J.1231.2010.06741
- [28] 黄火清, 郁昂. 环介导等温扩增技术的研究进展[J]. 生物技术, 2012, 22(3): 90-94. DOI: 10.3969/j.issn.1004-311X.2012.03.76
- [29] Thekisoe OM, Bazie RS, Coronel-Servian AM, et al. Stability of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) reagents and its amplification efficiency on crude trypanosome DNA templates[J]. J Vet Med Sci, 2009, 71(4): 471. DOI: 10.1292/jvms.71.471
- [30] Mcmanus DP, Zhang W, Li J, et al. Echinococcosis[J]. Lancet, 2003, 362(9392): 1295-1304. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)14573-4
- [31] 张亚楼, 温浩, 马旭东, 等. 家犬粪便中的细粒棘球绦虫 DNA PCR 检测方法的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2006, 1(5): 363-365. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5234.2006.05.013
- [32] Osman AMA, Aradaib IE, Ashmaig ALK, et al. Detection and differentiation of *Echinococcus granulosus*-complex using a simple PCR-based assay[J]. International Journal of Tropical Medicine, 2012, 4(1): 24-26. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.12.012
- [33] Bretagne S, Guillou JP, Morand M, et al. Detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fox faeces using DNA amplification[J]. Parasitology, 1993, 106(2): 193-199. DOI: 10.1017/S0031182000074990
- [34] Abbasi I, Branzburg A, Campos-Ponce M, et al. Copro-diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence[J]. Am J Trop Med Hyg, 2003, 69(3): 324-330. DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.08.062
- [35] 张亚楼, Bart Jean Mathieu, 温浩, 等. PCR 方法诊断家犬感染细粒棘球绦虫的特异性及在临床诊断中的应用价值[J]. 中华地方病学杂志, 2006, 25(5): 565-567. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-4955.2006.05.030
- [36] Štefanic S, Shaikenov BS, Deplazes P, et al. Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* ("sheep strain") in naturally infected dogs[J]. Parasitol Res, 2004, 92(4): 347-351. DOI: 10.1007/s00436-003-1043-y
- [37] Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A, et al. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa[J]. Int J Parasitol, 2004, 34(5): 645-653. DOI: 10.1016/j.ijpara.2003.12.013
- [38] Al-Sabi MNS, Kapel CMO, Deplazes P, et al. Comparative copro-diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes[J]. Parasitol Res, 2007, 101(3): 731-736. DOI: 10.1007/s00436-007-0537-4
- [39] Bowles J, Mcmanus DP. Genetic characterization of the *Asian Taenia*, a newly described taeniid cestode of humans[J]. Am J Trop Med Hyg, 1994, 50(1): 33. DOI: 10.1016/0001-706X(94)90045-0
- [40] Bowles J, Mcmanus DP. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*[J]. Int Journal for Parasitol, 1993, 23(7): 969-972. DOI: 10.1016/0020-7519(93)90065-7
- [41] Scott JC, Stefaniak J, Pawlowski ZS, et al. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus* [J]. Parasitology, 1997, 114(1): 37-43. DOI: 10.1017/s0031182096008062
- [42] Lavikainen A, Lehtinen M J, Meri T, et al. Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus* [J]. Parasitology, 2003, 127(Pt 3): 207-215. DOI: 10.1017/s0031182003003780
- [43] Thompson R C. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*[J]. Exp Parasitol, 2008, 119(4): 439-446. DOI: 10.1016/j.exppara.2008.04.016
- [44] Saarma U, Jögisalu I, Moks E, et al. A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence[J]. Parasitology, 2009, 136(3): 317-328. DOI: 10.1017/S0031182008005453
- [45] Torgerson, Paul R, Deplazes, et al. Echinococcosis: diagnosis and diagnostic interpretation in population studies[J]. Trends Parasitol, 2009, 25(4): 164-170. DOI: 10.1016/j.pt.2008.12.008
- [46] Wang N, Li DS, Zhou X, et al. A sensitive and specific PCR assay for the detection of *Baylisascaris schroederi* eggs in giant panda feces[J]. Parasitol Int, 2013, 62(5): 435-436. DOI: 10.1016/j.parint.2013.05.004