

两种检测方法应用于城市水源中蓝氏贾第鞭毛虫和隐孢子虫污染的比较研究

张小萍* 朱倩 蒋守富 江莉 何艳燕 张耀光 王真瑜

【摘要】目的 用 PCR 和免疫荧光染色镜检法检测城市现场水源中蓝氏贾第鞭毛虫 (简称贾第虫) 和隐孢子虫, 了解上海市水源地贾第虫和隐孢子虫污染状况。 **方法** 采集上海市 8 个区的自来水和 3 个区的环境水, PCR 检测水样本中的贾第虫磷酸丙糖异构酶 (triosephosphate isomerase, Tim) 基因和隐孢子虫 18S rRNA 的基因; 按《生活饮用水标准检验方法》(GB5750.12-2006) Filt-*Max* Xpress 快速方法进行免疫荧光染色镜检。计算比较两种方法检测贾第虫和隐孢子虫的阳性率。 **结果** 共采集 200 份水样; 其中自来水出厂水 48 份, PCR 和荧光镜检法均未检出贾第虫和隐孢子虫; 检测原水、动物饲养场周边池水、污水处理厂出水、游泳池水和餐馆养鱼池等水样分别为 62、25、29、20、16 份, PCR 法贾第虫阳性率分别为 8.1%、36.0%、17.2%、0 和 0, 总阳性率为 12.5%; 隐孢子虫阳性率分别为 6.5%、40.0%、13.8%、0 和 0, 总阳性率为 11.8%。免疫荧光染色镜检法贾第虫阳性率分别为 9.7%、40.0%、24.1%、0 和 0, 总阳性率为 15.1%; 隐孢子虫阳性率分别为 8.1%、44.0%、17.2%、0 和 0, 总阳性率为 13.8%。两种方法检测贾第虫和隐孢子虫一致性分别为 96.1% 和 95.4%, 经 *Kappa* 检验, 两种方法一致性较好 (*Kappa*=0.83 和 0.79, *Kappa*>0.75), PCR 与荧光镜检结果无显著性差异 ($\chi^2=0.44$ 和 0.26, *P*<0.05)。 **结论** 两种方法均可用于城市现场水源中贾第虫和隐孢子虫污染的调查。自来水未检出贾第虫和隐孢子虫, 但在原水和环境水中检测到贾第虫和隐孢子虫污染, 需加强监测。

【关键词】 蓝氏贾第鞭毛虫; 隐孢子虫; 包裹; 卵囊; 检测; 水样

Comparison of two approaches in detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp. contamination in various water of urban area Zhang Xiaoping*, Zhu Qian, Jiang Shoufu, Jiang Li, He Yanyan, Zhang Yaoguang, Wang Zhenyu. Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai Institutes of Preventive Medicine, Shanghai 200336, China

*Corresponding author: Zhang Xiaoping, Email: zhangxiaoping@scdc.sh.cn

Supported by Shanghai Municipality Health Bureau (20114190)

【Abstract】Objective To understand the contamination status with *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp. in different sources of water in urban area of Shanghai, by application of two tests including PCR and fluorescence microscopy. **Methods** The effluent water samples from water plants were collected from 8 districts and environmental water from 3 districts. The PCR was performed to detect the DNA extracted from the water samples targeting the triosephosphate isomerase (Tim) gene for *Giardia* spp. and 18S rRNA gene for *Cryptosporidium* spp., respectively. The immune-fluorescence microscopy assay (IFA) was performed following Filt-*Max* Xpress methods based on procedures described in "The National Standard of Detection for Drinking Water (GB5750.12-2006)". The positive rates of detecting contamination with *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. were compared. **Results** A total of 200 water samples were collected. No positive sample was found contaminated with *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in 48 samples of effluent water from water plants. In water samples, collected from source water of water plant (62 samples), pool water close to animal farms (25 samples), outdoor water of sewage treatment plant (29 samples), swimming pool water (20 samples), and water of fish pond in restaurant (16 samples), the general positive rates of *Giardia* spp. by PCR was 12.5% with 8.1%, 36.0%, 17.2%, 0 and 0, and the general positive rates of *Cryptosporidium* spp. by PCR was 11.8% with 6.5%, 40.0%,

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2015.06.009

基金项目: 上海市卫生局科研项目 (20114190)

作者单位: 200336 上海, 上海市疾病预防控制中心, 上海市预防医学研究院

* 通信作者: 张小萍, Email: zhangxiaoping@scdc.sh.cn

13.8%, 0 and 0, in above samples respectively. The general positive rate of *Giardia* spp. by IFA was 15.1% with 9.7%, 40.0%, 24.1%, 0 and 0, and the general positive rate of *Cryptosporidium* spp. by IFA was 13.8% with 8.1%, 44.0%, 17.2%, 0 and 0, in above samples respectively. In *Kappa* test, the identity of two approaches was good with $Kappa \geq 0.75$ ($Kappa=0.83$ and 0.79). The positive rates of water samples in PCR and IFA had no significantly difference ($\chi^2=0.44$ and 0.26 , $P < 0.05$). **Conclusion** The two established approaches, including PCR and IFA, are feasible to be used in epidemiological survey in urban areas. No parasites were detected in the effluent water samples from water plants, but the source water of water plant and environmental water were contaminated with *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. which need to strengthen the surveillance in future.

[Key words] *Giardia lamblia*; *Cryptosporidium* spp.; Oocyst; Cyst; Detection; Water sample

蓝氏贾第鞭毛虫 (*Giardia lamblia*) 和隐孢子虫 (*Cryptosporidium* spp.) 是导致人及多种哺乳动物腹泻的重要机会性致病性原虫, 也是艾滋病患者合并感染的重要病原体, 因此, 介水传播的贾第虫病和隐孢子虫病严重影响公众的健康^[1]。世界范围内蓝氏贾第鞭毛虫 (简称贾第虫) 和隐孢子虫的感染率分别为 1%~30% 和 0.6%~25.0%^[2-3], 曾有报道我国总感染率分别为 2.52% 和 2.14%^[4]。感染贾第虫或隐孢子虫的家畜、野生动物和人的粪便是地表水中贾第虫和隐孢子虫的主要来源。目前检测贾第虫和隐孢子虫主要是采用镜检的方法, 由于贾第虫包囊和隐孢子虫卵囊体积均极微小, 在形态上难以区分。因此建立敏感性高、特异性强的 PCR 检测技术, 对追踪污染来源、预防控制感染具有重要意义^[5-6]。为了解上海市水源贾第虫和隐孢子虫污染状况, 本研究利用基因检测法和免疫荧光染色镜检法, 于 2013—2014 年对上海市自来水、原水和环境水中贾第虫和隐孢子虫进行检测, 并对两种方法进行比较分析。

1 材料与方法

1.1 虫株

贾第虫滋养体由中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所惠赠, 人源贾第虫包囊由本实验室分离自上海市江湾医院的 1 例贾第虫感染者。微小隐孢子虫 (*C. parvum*) 和贝氏隐孢子虫 (*C. baileyi*) 由中国农业科学院上海兽医研究所惠赠, 安氏隐孢子虫 (*C. andersoni*) 由河南农业大学惠赠, 保存于 2.5% 重铬酸钾溶液中, 存放 4 °C 冰箱备用。实验所用阴性对照水样为纯净水, 购自上海获特满饮料有限公司。

1.2 主要试剂

抗贾第虫和隐孢子虫免疫磁分离试剂盒购自

挪威 Dynal 公司, 免疫荧光染色试剂盒购自澳大利亚 BTF 公司, 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 染色试剂由 FITC Waterborne 公司生产, DNA 提取试剂盒为美国 MP Biomedicals 公司的产品, 2×Taq PCR Master Mix 为天根生化科技北京有限公司产品, 牛血清白蛋白 (BSA) 为美国 Sigma 公司产品。

1.3 水样采集

根据不同地理位置采集上海市 8 个区的自来水出厂水, 每份水样 100 L。采集尚未进行调查的长宁、闵行和虹口 3 个区的黄浦江原水、动物饲养场周边池水、污水处理厂出厂水、游泳池水和餐馆养鱼池等环境水, 每份水样 20 L。

1.4 样本处理

按照《生活饮用水标准检验方法》(GB5750.12-2006) Filta-Max Xpress 快速方法^[7]进行检测, 包括过滤、淘洗和浓缩 (动物饲养场周边池水直接沉淀离心), 免疫磁珠分离 (immunomagnetic separation, IMS)。浓缩后每份样品均分为 2 份, 一份用于免疫荧光染色镜检法检测, 一份用于 PCR 法检测。设阴、阳性对照进行质量控制, 设水样贾第虫和隐孢子阳性包囊回收对照, 回收率必须 $\geq 10\%$, 否则为无效检测。

1.5 免疫荧光染色镜检法

分离纯化的包囊和卵囊经单克隆免疫荧光抗体染色, 再经 DAPI 试剂染色进行鉴定, 荧光显微镜镜检并计数。

1.6 PCR 法

采用 FastDNA SPIN Kit for Soil 试剂盒提取水样沉淀中的贾第虫包囊和隐孢子虫卵囊基因组 DNA, 提取前分别置液氮 2 min、94 °C 2 min, 反复

冻融3次,破坏包囊、卵囊壁。对照样本为隐孢子虫或贾第虫、刚地弓形虫、溶组织内阿米巴和华支睾吸虫,并设阴性对照。

根据文献^[8-9]设计扩增贾第虫磷酸丙糖异构酶(triosephosphate isomerase, Tim)基因和隐孢子虫18S rRNA基因的引物分别为:5'-ATG CCT GCT CGT CGC CCC TTC-3', 5'-CAC TGG CCA AGC TTC TCG CAG-3'; 5'-AAC ACG GGA AAA CTC ACC AG-3', 5'-GTA CAA AGG GCA GGG ACG TA-3'。引物由英潍捷基(Invitrogen)上海生物技术有限公司合成。PCR反应体系均为:DNA模板2.5 μl, 2×Taq PCR Master Mix 25 μl, 10 μmol/L引物各1.5 μl, 10 mg/ml BSA 2 μl, ddH₂O 17.5 μl。Tim基因反应条件为:94℃ 3 min; 94℃ 45 s, 50℃ 45 s, 72℃ 1 min, 30个循环; 72℃ 8 min。18S rRNA基因扩增反应条件为94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35个循环; 72℃ 10 min。扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳观察。分别将贾第虫Tim基因和隐孢子虫18S rRNA基因扩增产物送英潍捷基上海生物技术有限公司测序,并与GenBank的相应序列进行比较。

1.7 统计学分析

采用SPSS 16.0软件录入数据,对两种方法检

测结果进行χ²检验, P<0.05时差异有统计学意义。采用Kappa检验比较两种检测方法的一致性, Kappa≥0.75时认为一致性较好。

2 结果

2.1 水样采集情况

共采集上海市8个区的自来水出厂水48份。采集上海市3个区的黄浦江原水15个点(62份)、动物饲养场冲洗池水6个点(25份)、污水处理厂出厂水7个点(29份)、游泳池水5个点(20份)和餐馆养鱼池4个点(16份)等环境水共152份。

2.2 免疫荧光染色镜检法检测

免疫荧光染色镜检法检测出厂水未检出贾第虫和隐孢子虫,原水、动物饲养场周边池水、污水处理厂出厂水、游泳池水和餐馆养鱼池水样贾第虫包囊阳性率分别为9.7%、40.0%、24.1%、0和0,总阳性率为15.1%。饲养场周边池水贾第虫阳性率显著高于原水(χ²=10.91, P<0.01)。阳性范围为1~7个/10 L,平均密度为2.4个/10 L。隐孢子虫卵囊阳性率分别为8.1%、44.0%、17.2%、0和0,总阳性率为13.8%。饲养场周边池水隐孢子虫阳性率显著高于原水(χ²=15.33, P<0.01)。阳性范围为1~54个/10 L,平均密度为8.0个/10 L(表1)

表1 水样中蓝氏贾第鞭毛虫和隐孢子虫的检测结果

Table 1 Detection on *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* in water samples

原虫 Protozoan	水样来源 Water sources	样本数 No. samples	PCR		IFA ^a		检出范围 (个/10L) Rages of detection (no. /10L)	密度 (均值±标准差) Density ($\bar{x}\pm s$)
			阳性数 (份) No. positive	阳性率 (%) Positive rate (%)	阳性数 (份) No. positive	阳性率 (%) Positive rate (%)		
贾第虫包囊 <i>Giardia</i> cysts	原水 Source water from water plant	62	5	8.1	6	9.7	1~3	1.7±0.8
	饲养场周边池水 Pool water near pasture areas	25	9	36.0	10	40.0	1~7	3.0±1.8
	污水厂出水 Outdoor water from waste water treatment plants	29	5	17.2	7	24.1	1~4	2.1±1.0
	游泳池 Swimming pool	20	0	0.0	0	0.0	-	-
	餐馆养鱼池 Fish pond in restaurant	16	0	0.0	0	0.0	-	-
合计 Total		152	19	12.5	23	15.1	1~7	2.4±1.4
隐孢子虫卵囊 <i>Cryptosporidium</i> oocysts	原水 Source water from water plant	62	4	6.5	5	8.1	1~4	2.1±1.1
	饲养场周边池水 Pool water near pasture areas	25	10	40.0	11	44.0	2~54	13.1±7.2
	污水厂出水 Outdoor water from waste water treatment plants	29	4	13.8	5	17.2	1~5	2.7±1.6
	游泳池 Swimming pool	20	0	0.0	0	0.0	-	-
	餐馆养鱼池 Fish pond in restaurant	16	0	0.0	0	0.0	-	-
合计 Total		152	18	11.8	21	13.8	1~54	8.0±13.4

a: 免疫荧光染色镜检法, a: Immune-fluorescence microscopy assay

2.3 PCR检测

贾第虫滋养体和贾第虫包囊DNA均扩增出1条680 bp左右的条带，与预计长度相等。而隐孢子虫、刚地弓形虫、溶组织内阿米巴、华支睾吸虫和阴性对照均未见相应条带，所用的引物在PCR反应中显示了高度的特异性。扩增产物经序列测定证实为贾第虫Tim基因片段。

分别对微小隐孢子虫、安氏隐孢子虫、贝氏隐孢子虫和对照DNA进行扩增。3种不同的隐孢子虫均可扩增出450 bp左右的目的片段。而其他4种寄生虫和阴性对照样本均未出现扩增反应。表明隐孢子虫的PCR引物也具有高度的特异性。扩增产物经序列测定证实为微小隐孢子虫、安氏隐孢子虫和贝氏隐孢子虫18S rRNA基因片段。

PCR检测自来水出厂水48份，未检出贾第虫和隐孢子虫特异性条带。原水、动物饲养场周边池水、污水处理厂出厂水、游泳池水和餐馆养鱼池水样贾第虫阳性率分别为8.1%、36.0%、17.2%、0和0，总阳性率为12.5%。饲养场周边池水贾第虫阳性率显著高于原水 ($\chi^2=10.30, P<0.01$)。隐孢子虫阳性率分别为6.5%、40.0%、13.8%、0和0，总阳性率为11.8%。饲养场周边池水隐孢子虫阳性率显著高于原水 ($\chi^2=14.85, P<0.01$)，并高于污水处理厂出厂水 ($\chi^2=4.80, P<0.05$) (表1, 图1, 图2)。

2.4 PCR与免疫荧光染色镜检法检测结果比较

PCR和免疫荧光染色镜检检测贾第虫出厂水均为阴性。原水和环境水中PCR检出贾第虫阳性19

份，免疫荧光染色镜检检出23份，两者相比差异无统计学意义 ($\chi^2=0.44, P>0.05$)。两种方法相结合，共检出贾第虫阳性24份，其中两种方法均为阳性者18份，均为阴性者128份，1份PCR阳性而镜检阴性，4份镜检阳性而PCR阴性，两种方法阳性一致性为75.0% (18/24)，总一致性为96.1% (146/152)，经Kappa检验，两者一致性较好 (Kappa=0.83, >0.75)。

两种方法检测隐孢子虫出厂水均为阴性。原水和环境中PCR检出隐孢子虫阳性18份，镜检法检出21份，两者相比无显著性差异 ($\chi^2=0.26, P>0.05$)。两种方法共检出隐孢子虫阳性23份，其中两种方法均为阳性者16份，均为阴性者129份，2份PCR阳性而镜检阴性，3份镜检阳性而PCR阴性，两种方法阳性一致性为69.6% (16/23)，总一致性为95.4% (145/152)，经Kappa检验，两者一致性较好 (Kappa=0.79, >0.75)。(表2)

2.5 隐孢子虫虫种测序结果

对PCR检出的18份隐孢子虫阳性样本进行序列测定，10份为安氏隐孢子虫，4份为猪隐孢子虫 (*C. suis*)，2份为贝氏隐孢子虫，1份微小隐孢子虫和1份人隐孢子虫 (*C. hominis*)。不同水源中隐孢子虫虫种分布见表3。

3 讨论

随着分子生物学技术的发展，PCR技术在病原检测和分子诊断方面得到了广泛的应用，已经成为

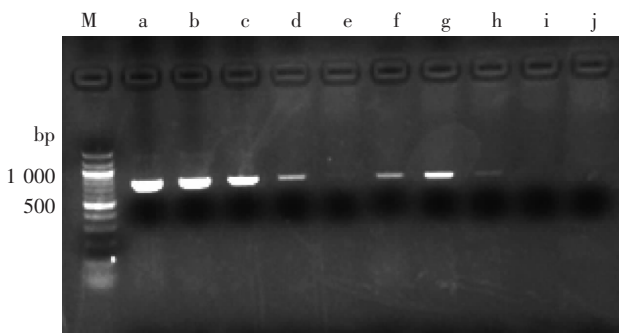


图1 蓝氏贾第鞭毛虫PCR结果

M: DNA 标志物, a: 贾第虫阳性对照, b-i: 样本, j: 阴性对照

Fig. 1 Results of PCR products for *Giardia lamblia*

M: DNA marker, a: *G. lamblia* positive control, b-i: Samples, j: Negative control

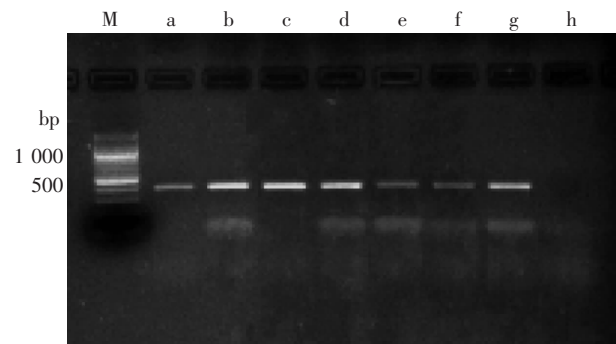


图2 隐孢子虫PCR结果

M: DNA 标志物, a: 微小隐孢子虫阳性对照, b-g: 样本, h: 阴性对照

Fig. 2 Results of PCR products for *Cryptosporidium* spp.

M: DNA marker, a: *C. parvum* positive control, b-g: Samples, h: Negative control

一种常用的病原分子检测方法。分子生物学检测工具已越来越多地应用到贾第虫和隐孢子虫的检测和传播特征研究中。目前免疫荧光染色镜检法对贾第虫和隐孢子虫的检测能检出这两种原虫的污染程度,但无法区分虫种。而核酸检测能进行基因分型,可对污染源进行有效评估。本研究对隐孢子虫进行基因分型,取得了较满意的效果。两种方法检测结果相比无显著性差异,两者一致性较好 ($Kappa \geq 0.75$)。

两种方法检测自来水均未检出贾第虫和隐孢子虫,与Srisuphanunt和陈小岳等^[10-11]检测结果一致。原水 and 环境水中贾第虫和隐孢子虫PCR与免疫荧光染色镜检结果的阳性一致性分别为75.0%和69.6%。低于Marer等^[12]用PCR扩增检测污水中贾第虫包囊PCR方法与免疫荧光显微镜检法的一致性(100%),与隐孢子虫卵囊的一致性结果(63%~72%)基本类似。分析原因可能是由于样品杂质对PCR产生抑制作用影响,样品中包囊/卵囊数量少,样品的随机分配有可能导致两种方法检测结果不一致。因此,当两种方法相结合应用时,可对水中贾第虫和隐孢子虫的污染程度和污染来源进行有效评

估。

免疫荧光染色镜检原水中贾第虫和隐孢子虫阳性率比法国、匈牙利和我国其它地区调查结果^[13-16]要低,结果显示上海市原水中贾第虫和隐孢子虫阳性率和平均密度均较低。污水处理厂出厂水的贾第虫和隐孢子虫阳性率比我国其它地区调查结果略低^[17],动物饲养场周边池水贾第虫和隐孢子虫阳性率显著高于原水,与动物贾第虫和隐孢子虫感染率较高有关^[18-20]。应加强管理,预防贾第虫和隐孢子虫污染其他水源。游泳池中发生疾病的危险主要与致病原生动有关,包括贾第虫和隐孢子虫^[21]。由游泳池中粪便意外排泄污染引起,这两种生物对环境和消毒剂有强抵抗力,并有高度的传染性。国外已有多起因娱乐用水导致贾第虫和隐孢子虫暴发的报道^[22],我国报道较少。本次调查未检出贾第虫和隐孢子虫,达到了游泳池“推荐水质标准”中贾第虫和隐孢子虫指标要求。但对于娱乐场所仍需加强监测。

上海市以前曾开展过水样中贾第虫和隐孢子虫污染调查,如笔者于2008—2009年对上海市16个区饮用水和5个区环境水采用纤维膜过滤、手工淘洗、

表2 水样PCR与免疫荧光染色镜检检测结果比较

Table 2 Comparison of protozoan detections in water between PCR and IFA

检测方法 Test	原虫 Protozoan species	检测结果 Test results	PCR		
			+	-	合计 Total
免疫荧光染色镜检 Immune-fluorescence microscopy assay	贾第虫 <i>Giardia lamblia</i>	+	18	5	23
		-	1	128	129
	合计 Total	19	133	152	
	隐孢子虫 <i>Cryptosporidium</i> spp.	+	16	5	21
		-	2	129	131
	合计 Total	18	134	152	

表3 不同水源中隐孢子虫虫种分布

Table 3 The distribution of *Cryptosporidium* species in different sources of water

水样来源 Water sources	安氏隐孢子虫 <i>C. andersoni</i>	猪隐孢子虫 <i>C. suis</i>	贝氏隐孢子虫 <i>C. baileyi</i>	微小隐孢子虫 <i>C. parvum</i>	人隐孢子虫 <i>C. hominis</i>	合计 Total
原水 Source water from water plant	2	1	0	1	0	4
饲养场周边池水 Pool water near the pasture areas	6	3	1	0	0	10
污水厂出水 Outdoor water from waste water treatment plants	2	0	1	0	1	4
合计 Total	10	4	2	1	1	18

磁抗体分离和免疫荧光染色进行贾第虫和隐孢子虫检测^[23]。本次调查采用Flita-Max Xpress快速方法滤芯过滤,对尚未开展环境水调查的3个区进行检测,并增加对娱乐用水游泳池和餐馆养鱼池水的检测,结果显示平均密度较以往有所增高,可能与检测灵敏度提高有关。同时,本研究采用PCR技术应用于水源中贾第虫和隐孢子虫污染的基因检测,并对隐孢子虫进行基因分型,通过基因溯源,提示家畜可能是原水和环境水中的主要污染源。

参 考 文 献

- [1] Brandonisio O. Waterborne transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*[J]. *Parassitologia*, 2006, 48(1-2): 91-94.
- [2] Escobedo AA, Cimerman S. Giardiasis: a pharmacotherapy review [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2007, 8(12): 1885-1902.
- [3] 周晓农. 机会性寄生虫病[M]. 1版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 98.
- [4] 吴观陵. 人体寄生虫学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 122, 185.
- [5] 朱惠丽, 张龙现, 宁长申, 等. 人兽共患隐孢子虫种类及基因型[J]. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2007, 14(1): 48-55.
- [6] 商立民, 金洪涛, 刘全. 贾第虫病分子生物学诊断方法及其应用[J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(7): 660-662.
- [7] 中华人民共和国国家标准. GB/T 5750.12-2006. 生活饮用水标准检验方法-微生物指标[S]. 1版. 北京: 中国标准出版社, 2007: 19-30.
- [8] 卢思奇, 王风云, 张可, 等. 两种机会性寄生虫——微小隐孢子虫和蓝氏贾第鞭毛虫基因检测方法的建立[J]. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(10): 884-888.
- [9] 沈玉娟, 曹建平, 卢潍媛, 等. 微小隐孢子虫卵囊DNA提取及用于PCR检测[J]. *中国寄生虫学和寄生虫病杂志*, 2005, 23(4): 228-230.
- [10] Srisuphanunt M, Karanis P, Charoenca N, et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in environmental waters of southwest coastal areas of Thailand [J]. *Parasit Res*, 2010, 106(6): 1299-1306.
- [11] 陈小岳, 王国强, 钱红, 等. 某市农村饮用水中贾第鞭毛虫和隐孢子虫污染状况调查[J]. *环境卫生学杂志*, 2015, 5(1): 36-38, 43.
- [12] Mayer CL, Palmer CJ. Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in waste water[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(6): 2081-2085.
- [13] Castro-Hermida JA, Gareia-Preseido I, Almeida A, et al. Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water[J]. *Sci Total Environ*, 2008, 405 (1-3): 45-53.
- [14] Plutzer J, Tako MH, Marialigeti K, et al. First investigations into the prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in Hungarian drinking water[J]. *J Water Health*, 2008, 5(4): 573-584.
- [15] 王秀英, 李永浩, 余淑苑, 等. 深圳市地表水贾第鞭毛虫和隐孢子虫污染状况的调查[J]. *中国公共卫生管理*, 2006, 22(3): 259-261.
- [16] 王戈平, 马利青, 蔡其刚, 等. 三江源地区饮用水源中隐孢子虫和贾地鞭毛虫的检测[J]. *青海畜牧兽医杂志*, 2012, 42(4): 10-11.
- [17] 肖淑敏, 赵晓芸, 张岩. 天津市某污水处理厂出水中贾第虫和孢子虫含量及其潜在健康危害[J]. *环境与职业医学*, 2015, 32(7): 637-641.
- [18] 周春香, 何国声, 张龙现. 牦牛隐孢子虫感染调查[J]. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(4): 389-390.
- [19] 仇书兴, 卢庆斌, 齐萌, 等. 河南省猪隐孢子虫感染调查[J]. *中国人兽共患病学报*, 2008, 24(5): 481-482.
- [20] Barwick RS, Mohammed HO, White ME, et al. Prevalence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. on dairy farms in southeastern New York state[J]. *Prev Vet Med*, 2003, 59(1-2): 1-11.
- [21] 郑大华, 傅文华. 国家游泳中心池水水质问题分析[J]. *给水排水*, 2008, 34(4): 71-79.
- [22] Hopkins J, Hague H, Hudgin G, et al. An outbreak of *Cryptosporidium* at a recreational water park in Niagara Region, Canada [J]. *J Environ Health*, 2013, 75(9): 28-33.
- [23] 张小萍, 何艳燕, 朱倩, 等. 上海市饮用水和环境水中隐孢子虫和蓝氏贾第鞭毛虫污染状况调查[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2010, 28(6): 81-84.

(收稿日期: 2015-09-06)

(本文编辑: 孙雅雯, 陈勤)