

中国卫氏并殖吸虫分子鉴定和遗传进化的研究概况

艾琳 陈木新 张永年 陈韶红 陈家旭*

【摘要】 卫氏并殖吸虫病是我国重要的食源性寄生虫病之一，其病原体通过蝾螈、溪蟹传播，可寄生于人体及多种哺乳动物组织、脏器内，引起肺吸虫病。我国是重要的卫氏并殖吸虫分布国度，有 25 个省（市、自治区）有分布卫氏并殖吸虫的报告。在卫氏并殖吸虫分类地位的研究中，仅靠形态学技术很难全面揭示该虫种的分子多样性。近些年来，随着分子生物学技术的发展，采用各种分子方法对卫氏并殖吸虫进行分类和鉴定的技术展现出很大的优势。分子遗传技术的应用也为阐明卫氏并殖吸虫的生物学、流行病学和遗传学特性提供了有效的手段和方法。但是，这些分子方法的敏感性和特异性以及其检测时间和花费又有着明显的差异，需要根据不同的研究场合使用相应的方法。分子方法的应用能更好地揭示卫氏并殖吸虫的流行病学和进化的特性，并能为该虫引起的疾病提供更为有效的诊断方法和防控手段。因此，该文概述了我国用于卫氏并殖吸虫分子鉴定和遗传进化的分子手段和方法。

【关键词】 卫氏并殖吸虫；分子鉴定；遗传进化

Research on molecular identification and genetic evolution of *Paragonimus westermani* in China Ai Lin, Chen Muxin, Zhang Yongnian, Chen Shaohong, Chen Jiayu*. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health, WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China

*Corresponding author: Chen Jiayu, Email: chenjiayu1962@163.com

Supported by National Science and Technology Major Project(2008ZX10004-011, 2012ZX10004220), National Key Technology Research and Development Program(2008BAI56B03) and Special Technical Standards for Science and Technology Commission of Shanghai, China(09DZ0503100)

【Abstract】 Paragonimiasis is one of the important food borne parasitic diseases in China. The causal agent is *Paragonimus westermani*, transmitted via freshwater crayfish or crabs, which can parasite in human tissues and organs and various other mammals to cause diseases. Our country is an important *P. westermani* distribution country, with 25 provinces (cities, districts) reported. In the taxonomic status of *P. westermani*, it is difficult to fully reveal the molecular diversity only depending on morphological techniques. Recently, the development of molecular biology techniques has great advantages to use a variety of molecular methods for identifying and classifying this trematode. The application of molecular genetic techniques will provide effective tools and methods to illustrate the biology, epidemiology and genetics of *P. westermani*. However, due to the significant difference in the sensitivity and specificity of molecular detection methods, as well as their time and cost, it needs to use appropriate methods depending on the study occasions. The application of molecular approaches may be better to reveal the epidemiological and evolutionary characteristics of *P. westermani*, and provide more effective diagnostic methods for the prevention and control of *Paragonimus*. So we review the molecular tools and methods of the molecular identification and genetic evolution of paragonimus in China.

【Key words】 *Paragonimus westermani*; Molecular identification; Genetic evolution

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2015.02.011

基金项目：国家科技重大专项（2008ZX10004-011，2012ZX10004220）；国家科技支撑计划（2008BAI56B03）；上海市科委项目（09DZ0503100）

作者单位：200025 上海，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，世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心

*通信作者：陈家旭，Email: chenjiayu1962@163.com

卫氏并殖吸虫 (*Paragonimus westermani*) 是一种重要的人兽共患食源性寄生虫,也是引起人体并殖吸虫病的重要虫种之一^[1]。在我国,该虫种主要分布在东北、西南、华东、华南等地区的25个省、自治区^[2],通过淡水虾蟹传播。其致病原因主要是童虫或成虫在人体组织和器官内移行、寄生造成的机械性损伤及其代谢产物等引起的免疫病理反应。人体卫氏并殖吸虫病根据病变过程可分为急性期及慢性期,其特点是潜伏期不固定,感染后可长期无明显症状。多数患者在感染后半年左右才缓慢发病,也可再一次重症感染后急性发病^[3]。症状因虫体寄生的部位不同而异,以胸、腹和脑的损害较为多见^[1]。据估计,全球有近2 900万患者,我国患者约占一半^[4]。流行病学学数据显示,人体卫氏并殖吸虫病在我国江浙沪地区呈增长趋势^[5]。

传统的卫氏并殖吸虫的虫种鉴定主要应用形态学方法进行,在光学显微镜或电镜下辨别其各期形态^[6]。由于分布地域等生态环境因素的长期影响,种群间存在不同程度的遗传和变异,这些变化用传统的方法很难区分。因此,传统的形态学技术不能满足快速、准确、高灵敏度及特异性检测需要。随着分子生物学技术,尤其是PCR技术和核酸测序技术的迅速发展,分子生物学技术也广泛应用于卫氏并殖吸虫的基因鉴定和遗传进化的研究^[7-10]。常用方法包括PCR、实时荧光定量PCR、PCR限制性酶切多态 (PCR-linked restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)、PCR随机扩增多态 (PCR-based random amplified polymorphic, PCR-RAPD) 以及环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 等^[11-15]。

本文对我国卫氏并殖吸虫分子鉴定技术和这些技术在卫氏并殖吸虫遗传进化方面的研究进行了概述,旨在为该虫的快速和准确的鉴定以及进化变异的研究提供资料。

1 我国卫氏并殖吸虫的分子鉴定

1.1 PCR

PCR是体外酶促合成特异DNA片段的一种方法,它不仅可用于基因分离、克隆和核酸序列分析等基础研究,还可用于疾病的诊断或任何有DNA、RNA的地方^[16-17]。在卫氏并殖吸虫的基因扩增研究中,常选用线粒体基因和核糖体基因为PCR扩增的研究对象。线粒体细胞色素c氧化酶亚基 I (cytochrome c oxidase subunit 1, CO1) 和烟酰胺脱氢

酶亚基 I (NADH dehydrogenase subunit 1, ND1) 基因属于线粒体基因组,进化速率较快,适用于种遗传差异的研究;核糖体DNA内转录间隔区2 (second internal transcribed spacers, ITS2) 基因属于核基因组,相对保守,适用于并殖吸虫种间差异的研究^[18-19]。Ryu等^[20]对来自安徽省旌德和休宁县的7株卫氏并殖吸虫成虫线粒体CO1、ND1和核糖体ITS2进行了检测。结果显示来自休宁的并殖吸虫为卫氏并殖吸虫,来自旌德的为大平并殖吸虫。基因片段扩增长度为230 bp,两种并殖吸虫只有6个碱基位点的差异。陆子云等^[21]对广东省5个调查点的人工感染获得的卫氏并殖吸虫成虫样本进行CO1、ITS2基因PCR扩增与测序,并将测序结果与GenBank检索到的卫氏并殖吸虫CO1、ITS2基因序列经BLAST比对,CO1及ITS2基因同源性在98%~99%。进一步确定广东省新发现5处并殖吸虫疫源地虫种为卫氏并殖吸虫,且与GenBank中检索到基因序列无明显差异。

1.2 实时荧光定量PCR

除了常规PCR外,实时荧光定量PCR技术已广泛应用于各种基因成分的检测。该技术于1996年由美国Applied Biosystems公司推出,所谓实时荧光定量,是指在PCR反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法^[22]。赵昕等^[12]根据卫氏并殖吸虫的ITS2基因序列,设计特异性的引物和探针,应用实时荧光PCR技术直接检测卫氏并殖吸虫的基因,故比形态学鉴定和血清学方法可靠,重复性好,且检测灵敏度可达0.1 pg DNA,比常规PCR检测灵敏度高出1 000倍。

1.3 PCR-RFLP

PCR-RFLP技术也是研究寄生虫基因的常用方法。PCR-RFLP的基本原理是用PCR扩增目的DNA,扩增产物再用特异性内切酶消化切割成不同大小片段,直接在凝胶电泳上分辨。不同等位基因的限制性酶切位点分布不同,产生不同长度的DNA片段条带。此项技术大大提高了目的DNA的含量和相对特异性,而且方法简便,分型时间短。这种方法与RFLP相比,不同的是以扩增替代了酶切,避免了RFLP繁琐的DNA酶切、转移、杂交等步骤^[23-24]。在卫氏并殖吸虫的研究中,也有关于PCR-RFLP方法应用的报道。王恩荣等^[25]曾以2n卫氏并殖吸虫基因

组DNA为探针,分别与两型卫氏并殖吸虫成虫DNA的7种限制性酶消化物进行杂交,发现有3种酶的酶切结果有差别,用*Pst* I酶切后,2n DNA比3n DNA多出一条6.6 kb的主带及几个小于6.6 kb的带。王继春等^[13]用经*Pst* I消化后的2n DNA为探针与被同一种酶消化的靶DNA杂交所得结果,不但证实了6.6 kb片段为2n卫氏并殖吸虫所独具,而且在另3株2n卫氏并殖吸虫中也得到支持。这充分显示66.6 kb片段作为鉴别不同染色体型别的指标是非常特异的。这也提示,辽宁、黑龙江及吉林省存在的二倍体型卫氏并殖吸虫在生物学地位上是近缘。张克新等^[26]对来自辽宁下露河、吉林桦甸及浙江松阳的卫氏并殖吸虫单个二倍体型进行6.6 kb片段扩增,发现与辽宁牛毛坞三倍体成虫基因组DNA的酶切位点明显不同。进一步支持和补充了王恩荣等的结果,进一步证实了*Pst* I酶切的6.6 kb片段在2n不同地理群稳定存在,具型特异性。该研究根据采用双酶切法可使单酶消化时的某些片段仍然保留,并出现新的片段的原理,用三倍体DNA为探针强化三组双酶切的结果,显示两型间极有意义的差别,从基因水平显示了两型卫氏并殖吸虫间的差别,说明两型间存在一定程度的基因变异。二者作为客观存在的群体,有可能向不同方向分化,在漫长的自然选择下,二者的差异逐渐积累,有形成两个独立虫种的趋势。

1.4 PCR-RAPD

PCR-RAPD是Williams等^[27]于1990年建立的通常以8~10 bp的随机寡核苷酸片段作为引物,对基因组DNA随机扩增,从而得到多态性图谱作为遗传标记的方法。与RFLP相比,RAPD的优点是对DNA质量要求不高,需要量极少,操作简单易行,不需要接触放射性一套引物可用于不同生物的基因组分析,检测整个基因组,两条引物配对使用,能产生新的带型,RAPD标记一般为重复序列,若不是重复序列,也可将其转化为RFLP标记,进一步检测RAPD分析的结果。PCR-RAPD具有快速、敏感、重复性好、可比性强的特点,特别适用于生物种群间遗传变异和种群分子标志的研究。卫氏并殖吸虫的致病性和品系长期以来有广泛的研究和较多争议,PCR-RAPD可望解决此问题。钱宝珍等^[14]应用B17和A9两个随机引物对来自宁海小汀和宁海西溪不同卫氏并殖吸虫进行扩增,结果提示,B17-1 600 bp, A9-680 bp可能作为肺型和肺外型卫氏并殖吸虫不同致病品系的分子标识。钱宝珍等^[28]通过浙江

典型肺型并殖吸虫病流行区绍兴兰亭、宁海小汀的卫氏并殖吸虫种群染色体研究结果认为,二倍体型也能引起典型肺部症状。浙江宁海小汀村是肺型卫氏并殖吸虫病流行区,44例患者有咳血、咳痰症状,在痰液中均能检获虫卵。而在宁海西溪村,溪蟹感染率和感染强度远高于小汀村,当地居民也有同样食用生蟹的生活习惯,但长期以来未见典型卫氏并殖吸虫病患者。该项研究采用PCR-RAPD技术,B17、A9两随机引物扩增产生特异性DNA片段,可区别宁海小汀和宁海西溪不同卫氏并殖吸虫种群,结果提示B17-1 600 bp, A9-680 bp可能作为肺型和肺外型卫氏并殖吸虫不同致病品系的分子标识。遂昌和临安两地卫氏并殖吸虫囊蚴PCR-RAPD指纹与宁海西溪卫氏并殖吸虫种群基本相符,提示两地卫氏并殖吸虫病属外型卫氏并殖吸虫病。

1.5 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增技术是2000年由日本荣研化学株式会社开发的一种新颖的恒温核酸扩增方法,能在等温(60~65℃)条件下,短时间(通常是1h内)内进行核酸扩增,是一种简便、快速、精确、低价的基因扩增方法。与常规PCR相比,不需要模板的热变性、温度循环、电泳及紫外观察等过程。该技术不依赖任何专门的仪器设备进行现场高通量快速检测,检测成本远低于荧光定量PCR。LAMP法的特征是针对靶基因上的6个区域设计4条引物,利用链置换型DNA聚合酶在恒温条件下进行扩增反应,可在15~60 min内实现 10^9 ~ 10^{10} 倍的扩增,反应能产生大量的扩增产物即磷酸镁白色沉淀,可以通过肉眼观察白色沉淀的有无来判断靶基因是否存在,是一种适合现场、基层快速检测的方法^[29-30]。Chen等^[15]采用环介导等温技术对卫氏并殖吸虫的成虫、囊蚴和虫卵进行检测。该方法仅需在45℃恒温加热下对含有特异引物和样本的混合物加热1h,检测结果便可用肉眼观察。该实验设计的特异引物不能扩增片形吸虫、华支睾吸虫、麝猫后睾吸虫、曼氏血吸虫和日本血吸虫DNA。LAMP方法检测卫氏并殖吸虫比常规的PCR技术敏感100倍,此方法能对卫氏并殖吸虫的成虫进行扩增,用作卫氏并殖吸虫的快速检测,尤其是对来自淡水虾蟹中的囊蚴和痰液中的虫卵更为适用。

2 我国卫氏并殖吸虫遗传进化和变异的研究

形态学及生活史一直是并殖吸虫分类的依据,但是由于受自然地理等生态环境因素的长期影响,

种群的种株之间存在不同程度的遗传分化, 这些变化用传统的方法很难区分。近年来, 分子生物学技术广泛应用于物种的遗传变异和分类, 直接从 DNA 水平反映基因本身, 具有优越性。

卫氏并殖吸虫的遗传进化和变异的研究中, 侯红斌等^[31]以部分 CO1 基因和 ITS2 基因为研究对象, 对来自日本、韩国、中国大陆、中国台湾、泰国、马来西亚和菲律宾的卫氏并殖吸虫进行了种株分类的分子研究。扩增产物测序后, 用计算机软件比较这两个序列在不同来源的虫种间的差异性。研究表明, ITS2 序列较 CO1 序列保守, 卫氏并殖吸虫 ITS2 的种内差异非常小, 或无差异。若用 CO1 序列进行分类, 根据不同的分析方法, 卫氏并殖吸虫可分为 3 或 4 个种群: 第一种群, 即东北种群, 包括来自日本、韩国、中国大陆和中国台湾的种株; 第二种群来自马来西亚; 第三种群来自菲律宾。在 Parsimony 分析中, 来自中国台湾的虫株独立于其他种群, 而在用 NJ 或 UPGMA 软件建立的树状分类图中, 此种群与菲律宾株很接近。由此可见, 该研究所涉及到的卫氏并殖吸虫不同地理株可分为两个种群: 亚洲东北部种群, 及东北部种群外的所有虫株组成的南亚种群。崔爱利等^[32]采用 PCR 扩增来自我国河口并殖吸虫、白水河并殖吸虫、勐腊并殖吸虫、曼谷并殖吸虫及象山并殖吸虫的 ITS2 和部分 CO1 基因, 已明确其分类地位。DNA 序列分析结果表明, 白水河并殖吸虫、勐腊并殖吸虫、曼谷并殖吸虫及象山并殖吸虫之间存在较小的差异。种系发生树可见, 这 4 种并殖吸虫在并殖吸虫属中彼此比较接近, 分类地位位于卫氏并殖吸虫与斯氏并殖吸虫之间。河口并殖吸虫与斯氏并殖吸虫在进化及亲缘关系上非常接近。刘超群等^[33]采用 RAPD 技术对来自中国 3 省 9 地 11 个地域株并殖吸虫进行遗传变异研究, 以便明确它们的亲缘关系, 为并殖吸虫的分类提供依据, 尤其为湖北省并殖吸虫流行区划分提供了分子生物学依据。RAPD 技术将 11 个地域株并殖吸虫分为 3 类: 来自江西武宁、浙江兰亭、湖北温泉和湖北赤壁的并殖吸虫分离株 (共 4 株) 为卫氏并殖吸虫; 来自湖北走马、湖北五峰、湖北十堰和湖北五里的 6 个分离株为斯氏并殖吸虫; 来自湖北神农架的分离株可能是其他未知的并殖吸虫。结果显示 11 个地域株并殖吸虫在基因水平上存在差异。

3 结语

目前, 卫氏并殖吸虫的分类和流行病学研究

大多依赖形态学检测方法。但是, 由于所处地域差异、宿主的不同, 虫体发育阶段的不同, 导致传统的方法难以对卫氏并殖吸虫进行准确的区分和检测。随着分子生物学技术的发展, 在卫氏并殖吸虫的分类、种群进化和个体变异等方面, 分子方法能从基因层面为鉴定和区分该虫种提供更有效的手段。

虽然在卫氏并殖吸虫的分子检测和遗传进化方面, 我国已有不少研究报道, 但是关于卫氏并殖吸虫遗传进化的研究还存在很多未解的难题。例如: 卫氏并殖吸虫二倍体和三倍体的基因组和转录组是否存在差异; 不同宿主是否会对卫氏并殖吸虫的基因型有影响; 卫氏并殖吸虫患者痰液中虫卵的分子检测手段的改良等, 尚有待于深入研究。

以上综述表明, 我国卫氏并殖吸虫分子检测和遗传进化研究已取得一定进展。随着分子生物学技术的不断发展, 对于卫氏并殖吸虫分子检测和遗传变异的研究将会越来越深入, 将会有越来越多的卫氏并殖吸虫的关键基因的功能被阐明, 这些研究可帮助人们全面了解卫氏并殖吸虫的生物学特征和与宿主之间的关系, 提供新的诊断方法, 筛选新的药物靶点和疫苗候选分子, 为控制和消灭卫氏并殖吸虫病开辟新途径。

参 考 文 献

- [1] Liu Q, Wei F, Liu W, et al. Paragonimiasis: an important food-borne zoonosis in China[J]. Trends Parasitol, 2008, 24(7): 318-323.
- [2] 诸欣平, 苏川. 人体寄生虫学[M]. 1版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 96-97.
- [3] Singh TS, Mutum SS, Razaque MA. Pulmonary paragonimiasis: clinical features, diagnosis and treatment of 39 cases in Manipur [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1986, 80(6): 967-971.
- [4] Keiser J, Utzinger J. Emerging foodborne trematodiasis[J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(10): 1507-1514.
- [5] Coordinating Office of the National Survey on the Important Human Parasitic Diseases. A national survey on current status of the important parasitic diseases in human population[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23(5 Suppl): 332-340.
- [6] Devi KR, Narain K, Agatsuma T, et al. Morphological and molecular characterization of *Paragonimus westermani* in northeastern India[J]. Acta Trop, 2010, 116 (1): 31-38.
- [7] Sugiyama H, Morishima Y, Kameoka Y, et al. Polymerase chain reaction (PCR)-based molecular discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage[J]. Mol Cell Probes, 2002, 16 (3): 231-236.
- [8] Li AH, Na BK, Kong Y, et al. Molecular cloning and characterization of copper/zinc-superoxide dismutase of *Paragonimus west-*

- ermani*[J]. J Parasitol, 2005, 91(2): 293-299.
- [9] Tandon V, Prasad PK, Chatterjee A, et al. Surface fine topography and PCR-based determination of metacercaria of *Paragonimus* sp. from edible crabs in Arunachal Pradesh, Northeast India[J]. Parasitol Res, 2007, 102 (1): 21-28.
- [10] Biswal DK, Chatterjee A, Bhattacharya A, et al. The mitochondrial genome of *Paragonimus westermani*(Kerbert, 1878), the Indian isolate of the lung fluke representative of the family Paragonimidae(Trematoda)[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e8484.
- [11] van Herwerden L, Blair D, Agatsuma T. Intra- and interindividual variation in ITS1 of *Paragonimus westermani*(Trematoda: digenea) and related species: implications for phylogenetic studies[J]. Mol Phylogenet Evol, 1999, 12(1): 67-73.
- [12] 赵昕, 郑秋月, 曹际娟, 等. 卫氏并殖吸虫PCR和实时荧光PCR快速检测方法的建立[J]. 生物技术通报, 2008, (z1): 358-361.
- [13] 王继春, 王恩荣, 张克斯. 6.6 kb基因组DNA片段鉴别两型4株卫氏并殖吸虫的结果[J]. 中国医科大学学报, 1993, 22(3): 167-169, 172.
- [14] 钱宝珍, 沈琦. 卫氏并殖吸虫致病品系PCR-RAPD标记的初步研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(3): 249-251.
- [15] Chen MX, Ai L, Zhang RL, et al. Sensitive and rapid detection of *Paragonimus westermani* infection in humans and animals by loop-mediated isothermal amplification(LAMP)[J]. Parasitol Res, 2011, 108(5): 1193-1198.
- [16] 李晓娟, 杨毅梅. PCR技术应用于寄生虫分类鉴定的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(1): 69-70.
- [17] 蔺东, 刘群, 蒋金书. PCR技术在寄生虫分类研究中的应用[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2002, 9(3): 172-175.
- [18] Le TH, Blair D, McManus DP. Mitochondrial DNA sequences of human Schistosomes: the current status[J]. Int J Parasitol, 2000, 30(3): 283-290.
- [19] Velavan TP, Schulenburg H, Michiels NK. Detection of multiple infections by monocystis strains in a single earthworm host using ribosomal internal transcribed spacer sequence variation[J]. Parasitology, 2010, 137(1): 45-51.
- [20] Ryu JS1, Hwang UW, Min DY, et al. Molecular identification of *Paragonimus ohirai* and *P. westermani* from Anhui Province, China[J]. Parasite, 2000, 7(4): 305-309.
- [21] 陆子云, 刘巧, 唐高兴, 等. 广东省部分地区卫氏并殖吸虫分布于DNA序列分析 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2013, 25(3): 275-279, 283.
- [22] 陈风华, 孙建华, 马盈盈, 等. 实时荧光定量PCR技术在病原体快检中的研究进展与应用[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(23): 11004-11006.
- [23] 李娜, 张敏, 崔彬, 等. PCR-RFLP技术在兽医寄生虫学上的应用[J]. 动物医学进展, 2007, 28(1): 92-95.
- [24] Huang WY, He B, Wang CR, et al. Characterisation of *Fasciola* species from mainland China by ITS-2 ribosomal DNA sequence [J]. Vet Parasitol, 2004, 120 (1-2): 75-83.
- [25] 王恩荣. 二倍体及三倍体卫氏并殖吸虫的DNA重复顺序的比较研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1992, 9(1): 46-49.
- [26] 张克斯, 王恩荣, 王继春. 两类型卫氏并殖吸虫DNA重复顺序的进一步比较观察[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1994, 7(3): 186-189.
- [27] 张红卫, 许汴利, 苏云普. RAPD-PCR技术筛选间日疟原虫基因标记[J]. 中国预防医学杂志, 2006, 7(4): 251-253.
- [28] 钱宝珍, 钱俊, 朱兴全. 浙江省卫氏并殖吸虫致病品系分子标记的研究[J]. 浙江省医学科学院学报, 1999, 6(38): 11-13.
- [29] Abbasi I, King CH, Muchiri EM, et al. Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* DNA by loop-mediated isothermal amplification: identification of infected snails from early prepatency[J]. Am J Trop Med Hyg, 2010, 83(2): 427-432.
- [30] Lau YL, Meganathan P, Sonaimuthu P, et al. Specific, sensitive, and rapid diagnosis of active toxoplasmosis by a loop-mediated isothermal amplification method using blood samples from patients[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(10): 3698-3702.
- [31] 侯红斌. 亚洲卫氏并殖吸虫的种系地域性分子研究[J]. 国外医学寄生虫病分册, 2002, 29(1): 37-38.
- [32] 崔爱利, 常正山, 陈明刚, 等. 用DNA序列分析我国5种并殖吸虫的分类地位[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21(1): 27-30.
- [33] 刘超群, 关飞, 陈彦, 等. 应用RAPD技术对我国11个地域株并殖吸虫遗传变异的逐步探讨[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(11): 1041-1044.

(收稿日期: 2014-12-08)

(本文编辑: 孙雅雯, 陈勤)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊对题名和摘要的要求

题名应以准确、简明的词语反映文章中最重要的特定内容,一般用短语,不用具有主、谓、宾结构的完整句。中文题名一般不超过 20 个汉字。如设副标题,可用冒号将副题名与主题名分开。题名中尽量避免使用非公知公认的缩略语、字符、代号等,应使用原形词。

论著类论文的摘要采用结构式,包括目的(Objective)、方法(Method)、结果(Results)和结论(Conclusions)4 部分。目的必须明确;方法描述要具体、详细、清楚,如果有随机分组必须交代随机的方法;结果中要给出关键性或主要的数据,百分率后要在括号中给出具体的数值比;结论要与目的呼应,必须是从该文的结果中推导出,不能把与结果无关的内容写到结论中。摘要采用第三人称撰写,不列图、表,不引用文献,不加评论和解释。英文题目和摘要一般与中文摘要内容相对应。

本刊编辑部