



肝片吸虫实验室检测技术研究进展

艾靖凯, 简莹娜, 张学勇*

(青海大学 农牧学院/畜牧兽医科学院, 青海西宁 810016)

摘要:肝片吸虫病是广泛分布在全世界的食源性人畜共患寄生虫病。肝片吸虫(*Fasciola hepatica*)分布广泛,感染可引起宿主贫血、胆管阻塞等,从而导致宿主营养不良、发育受阻、生产减缓,严重威胁着人畜安全、畜牧业的健康发展,同时引起食品安全问题。因此,需要快速、准确的检测方法鉴定和检出病原肝片吸虫。迄今为止,肝片吸虫的检测方法主要有病原学方法、分子生物学、免疫学方法等。本文就以上检测方法的研究进展进行概述,将为肝片吸虫的实验室诊断提供参考依据。

关键词:肝片吸虫;实验室检测;分子生物学;免疫学

[中图分类号] S855.9 [文献标志码] A [文章编号] 1004-6704(2025)-01-0103-05

Progress on Laboratory Detection Techniques of *Fasciola hepatica*

AI Jingkai, JIAN Yingna, ZHANG Xueyong*

(College of Agriculture and Animal Husbandry/Academy of Animal and Veterinary Sciences,
Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China)

Abstract: Fascioliasis is a food-borne zoonotic parasitic disease widely distributed worldwide. *Fasciola hepatica* is widely distributed, and can cause anemia and bile duct obstruction in hosts, resulting in malnutrition, developmental disruption, and production slowdown, which is a serious threat to the health of humans and animals, the healthy development of animal husbandry, and also causes food safety problems. Therefore, it needs a rapid and accurate method to identify and detect the pathogen *F. hepatica*. So far, the main detection techniques of *F. hepatica*, include pathogenetic methods, molecular biology, immunological methods and so on. This study provides an overview on the research progress of the above detection techniques, which will provide a reference basis for the laboratory diagnosis of *F. hepatica*.

Key words: *Fasciola hepatica*; laboratory detection; molecular biology; immunology

肝片吸虫(*Fasciola hepatica*)能够感染引发一种非常重要却被忽视的食源性人畜共患寄生虫病,其生活史复杂,以椎实螺为中间宿主,人、牛、羊等哺乳动物为终末宿主。肝片吸虫感染宿主后,可寄生家畜的肝脏、胆管内,造成肝脏损伤和胆管阻塞,导致家畜生长减缓、食欲减退、体重减轻、精神萎靡和

腹泻,严重时致家畜死亡^[1]。人类主要通过食用的或未熟透的经囊蚴感染的水生植物而感染肝片吸虫病^[2],造成胆管阻塞、胆管炎和胆结石,导致病人肝区疼痛、黄疸和贫血,少数虫体可能会异位寄生。肝片吸虫在世界范围内广泛分布,分布区域主要与中间宿主椎实螺的地理分布、环境条件有关^[3]。

肝片吸虫在我国主要分布在新疆、西藏、青海、甘肃、黑龙江、吉林、辽宁等牛羊养殖数量高的地区^[4-5],肝片吸虫已造成严重的经济损失,故需要建立针对肝片吸虫快速、准确、灵敏的诊断方法,实现肝片吸虫病的早期诊断,对防控该病具有重要意义。

随着诊断技术的飞速发展,越来越多的技术涌现,肝片吸虫的实验室诊断方法除了病原学方法外,

[收稿日期] 2024-06-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(32360889);青海省科技厅重点研发与转化计划—科技成果转化专项项目(2023-NK-135);青海省“昆仑英才·高端创新创业人才”项目(2022)

[第一作者] 艾靖凯(1999-),男,硕士研究生,主要从事人兽共患病病原生态学研究。E-mail: jingkaiaitq@outlook.com

*[通信作者] 张学勇, E-mail: zhang_xyong@163.com

又发展出了免疫学方法和分子生物学方法。传统的病原学方法仅是虫体在宿主体内发育到成虫期后才能在粪便中检测到虫卵,不仅费时费力、检测效率低和易造成假阴性结果,还会造成环境污染,危害家畜健康。免疫学和分子生物学方法敏感性高、特异性好、操作简便,适合临床批量检测,从而促进了诊断技术的发展^[6-7]。因此,本文总结了肝片吸虫的实验室检测方法,将为肝片吸虫的实验室诊断提供参考依据。

1 病原学方法

病原学方法是在体液或排泄物中检测虫体的方法,是寄生虫检测中的金标准,在粪便中镜检出黄色的椭圆形肝片吸虫的虫卵即可确诊肝吸虫病^[8]。常见粪检法包括直接涂片法、自然沉淀法和 Kato-Katz 法。2019 年, Zárate-Rendón 等^[9]用 Kato-Katz 法、Mini-FLOTAC 法和 Flukefinder 法检测人工感染 14、28、41、96 个虫卵的肝片吸虫粪样本,发现 Flukefinder 法除了检测 14 个虫卵的样品的敏感度为 60%外,其余皆为 100%,是一种较好的肝片吸虫检测方法。但只有肝片吸虫在宿主体内发育到成虫期时,才能在粪便中检测出虫卵,此时已危害人和动物健康,且带有虫卵的粪便也易导致环境污染。当感染率低、感染早期或异位寄生时,粪检法并不适用,易致假阴性,影响诊断检测结果,造成重大经济损失。因此,十分有必要开发肝片吸虫的早期诊断方法。

2 分子生物学检测方法

20 世纪 70 年代以来,分子生物学检测技术在肝片吸虫感染的诊断中发挥了巨大的作用。每种寄生虫都有特定的 DNA 序列,具有高度特异性,检测肝片吸虫特异的基因片段即可确诊感染。核糖体 DNA(rDNA)是片形吸虫遗传学研究中使用最多的分子遗传标记,其第一和第二内转录间隔区(ITS-1 和 ITS-2)位于大亚基和小亚基 rRNA 基因之间,是准确诊断和检测大片吸虫、肝片吸虫及其中间型的主要分子标记。其中 ITS-2 序列尤为重要,是诊断和鉴别大片吸虫、肝片吸虫及其中间型的主要分子标记,目前肝片吸虫的鉴定目标靶位是 18S_rRNA 基因片段^[10]。肝片吸虫的分子生物学检测技术主要包括聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、实时荧光定量 PCR(real time quantitative PCR, RT-PCR)、多重 PCR(multiplex polymerase chain reaction, mPCR)、环介导等温扩增技术(loop-

mediated isothermal amplification, LAMP)和重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)等。

2.1 聚合酶链式反应

PCR 是体外酶促合成 DNA 片段的方法,已成为最常用的分子生物技术之一。通过肝片吸虫 DNA 设计出特异性引物后,通过 PCR 特异性扩增,即可鉴别诊断样品是否存在肝片吸虫。PCR 方法特异性强、敏感度高,应用广泛^[11]。2020 年, Castilla 等^[12]根据两种片形吸虫 DNA 序列差异分别设计引物,扩增出肝片吸虫 304 bp 的 DNA 片段和巨片吸虫 752 bp 的 DNA 片段,并对从尼日利亚 33 头牛和 14 头绵羊中采集到的片形吸虫进行鉴定。结果显示,在牛体中肝片吸虫占 18/33(54.5%),巨片吸虫占 15/33(45.5%),绵羊体中肝片吸虫占 11/14(78.6%),巨片吸虫占 3/14(21.4%),证实尼日利亚存在片形吸虫。常规 PCR 方法成本低,产物可回收,灵敏度较高,但因操作过程繁琐、易污染、配合电泳技术也只能进行定性分析等问题而较为麻烦。

2.2 实时荧光定量

RT-qPCR 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团(染料或探针),利用荧光信号积累实时检测整个 PCR 进程。在整个反应体系中,荧光染料特异性掺入 DNA 双链中发出荧光信号,保证荧光信号的增加与 PCR 产物增加完全同步,可以得到定性或定量的结果^[13]。与传统 PCR 相比,RT-qPCR 可以准确、灵敏的测定样品 DNA 浓度,且操作更简便,敏感性和特异性更高。2017 年,王彩霞等^[14]选择肝片吸虫保守的核糖体 DNA ITS2 区域设计引物和 TaqMan 探针,建立了 RT-PCR 检测肝片吸虫的方法。此方法检测 DNA 敏感度可达 1 拷贝质粒 DNA,且特异性良好,与多种吸虫无交叉反应。2020 年,史恒志等^[15]对 250 只羊用显微镜检测、常规 PCR 和 RT-PCR 方法进行了肝片吸虫检测,结果显示 RT-PCR 能检测到的最小 DNA 量为 1.67 pg,建立了一种灵敏、特异性强的检测羊肝片吸虫 RT-qPCR 方法。RT-qPCR 荧光染料法(SYBR Green)通用性好,对 DNA 模板没有选择,但也因此可能会产生假阳性结果,需通过溶解曲线分辨结果特异性;RT-qPCR 探针法(TaqMan)特异性更强,适合多重 PCR 检测,但需要根据不同 DNA 序列合成不同探针,且定量时易受试剂和酶活性影响^[16]。

2.3 多重 PCR

mPCR 是在常规 PCR 反应体系中加入多对引物,同时扩增多个核酸片段的 PCR 技术,具有常规

PCR 的特异性和灵敏性等特点外,更加经济、省时,广泛应用于各种病原体的诊断。2018 年,Rathinasamy 等^[17]用多重 PCR 法来定量检测受肝片吸虫感染的蜗牛和采集到的肝片吸虫中提取到的 DNA,结果显示多重 PCR 和常规 PCR 在敏感性和特异性上无差别。2024 年,Heydarian 等^[18]对将从伊朗屠宰场采集到的 76 条肝片吸虫和 28 条巨片吸虫的 DNA 作为多重 PCR 模板,结果的准确率为 100%。虽然多重 PCR 对比常规 PCR 来说更加高效,但对引物之间易出现引物长度不同、退火温度不同及引物特异性等问题,所以在做实验之前需要对引物不断优化从而达到最佳扩增效果,对实验人员的实验技能要求较高。

2.4 重组酶聚合酶扩增技术

RPA 是一种等温检测技术,可在 37 °C 恒温条件下,设计利用简单的引物和高效的链置换聚合酶,20 min 左右扩增出检测产物,在资源有限的环境中即可实现快速的核酸检测^[19]。2017 年,Cabada 等^[20]用 RPA 和常规 PCR 检测低虫卵负荷粪便样本时的敏感度和特异性。结果显示,两种方法特异性良好,与其他吸虫、线虫均无交叉反应,且敏感性分别为 87%和 66%。此外,RPA 和 PCR 还能检测到 47%和 26%显微镜粪检未检出的肝片吸虫感染。RPA 技术实验条件简单,反应迅速,特异性高,但受制于实验条件,可能存在虫卵未完全裂解和操作等问题,仍需要不断优化实验过程以提高敏感性。

2.5 环介导等温扩增

LAMP 是 2000 年 Chaouch 等^[21]提出的新核酸扩增技术,是利用最少 4 条的引物设计和链置换酶,在恒温条件下,对 DNA 序列进行快速、高效的扩增,并呈指数级别放大核酸分子。因其简单性、特异性、快速和低成本等特点,已被广泛用于微生物检测和传染性疾病预防等方面。2022 年,Tran 等^[22]建立了一种可检测环境和粪便中肝片吸虫的 LAMP 方法,扩增时间小于 20 min,灵敏度高,检测极限值为 5×10^{-4} ng/ μ L 基因组 DNA,适用于现场的临时诊断。LAMP 因其优异性能和操作难度低等特点备受关注,但其反应条件、目的片段差过大、引物自连而产生假阳性等问题仍需要优化^[23]。

3 免疫学方法

免疫应答是机体在对抗原刺激时,产生特异性抗体的过程,是维持内环境稳定的重要方式。感染肝片吸虫宿主体内的抗原和特异性抗体,都具有很大的诊断价值,在临床和科研中都有广泛的应用。

3.1 酶联免疫吸附实验(ELISA)

ELISA 是将抗原或抗体结合在固相载体表面,利用抗原抗体的特异性结合以及抗体或者抗原上标记的酶催化特定底物发生显色反应,显色后可测得样品中抗体含量,常用 ELISA 法有直接法、间接法、夹心法、竞争法。ELISA 方法具有较高的灵敏度、特异性,且成本较低,适合大批量的样品检测^[24]。2019 年,Munita 等^[25]使用四种市售的 ELISA 试剂盒(Ildana Biotech, IDEXX, Svanova 和 Bio-X)对 22 份肝片吸虫阳性牛血清和 24 份阴性牛血清进行检测,结果显示 Ildana、IDEXX 和 Bio-X 的敏感度和特异性为 100%,Svanovir 的敏感度为 59%,特异性为 96%。2021 年,Aguayo 等^[26]以谷胱甘肽 S-转移酶作为包被抗原检测肝片吸虫,敏感性为 94.3%,特异性为 80.2%。2023 年,Drescher 等^[27]评估多种肝片吸虫鉴定蛋白,结果显示 FhrCL-1、FhES 和 FhrSAP-2 最适合作为肝片吸虫早期血清诊断的包被抗原。2023 年,段佳慧以重组蛋白 Fh010935 为包被抗原,建立了绵羊肝片吸虫间接 ELISA 法,对内蒙古某地区 90 份绵阳血清进行检测,阳性率为 22.2%;成功建立了基于循环抗原 Fh010935 的绵羊肝片吸虫感染双抗夹心 ELISA 法,与商品化的试剂盒检测结果符合率 100%。对内蒙古自治区、吉林省、黑龙江省某地区的 329 份绵羊血样进行检测,阳性率 7.29%,最早可检测出肝片吸虫感染后 13 天的血清循环抗原。ELISA 法成本低,适合大批量检测,但试剂盒的可靠性仍需要大量样品的检测来验证,且 ELISA 操作耗时较长。

3.2 胶体金免疫层析技术(GICA)

GICA 是特异性抗原固定在条状膜上,胶体金标记试剂吸附在结合垫上,将待检样品加在一端的样品垫上,当样品移动至胶体金标记与试剂相结合后,再与固定在膜上的抗原结合时,便可观察到显色结果,具有操作简单、便于携带、检测时间短等特点^[28]。2019 年,Wang 等^[29]利用重组蛋白 rCatL1D、rCatB4 及 rMeCatL-B,分别建立 ELISA 检测方法,通过筛选,rCatL1D 特异性和敏感性高于 rCatB4 和 rMeCatL-B。以重组蛋白 rCatL1D 为检测抗原建立的胶体金免疫层析技术,检测 426 头绵羊血清抗体,敏感性特异性分别为 97%和 100%,与间接 ELISA 法一致性达 99%。2023 年,段佳慧^[30]利用抗 FhD38 蛋白抗体成功建立了绵羊肝片吸虫双抗夹心胶体金免疫层析试纸法,对 329 份绵羊血清进行检测,阳性率为 6.99%,与间接 ELISA 法检测结果符合率 95.8%。GICA 法使用方便、结果易观察,但

其准确度高度依赖抗体的特异性,批量化的产品各批次间易有较大差异,而导致灵敏度低,结果无法定量,只能给出定性或半定量的结果。

3.3 斑点酶联免疫吸附试验(Dot-ELISA)

Dot-ELISA 是斑点免疫结合试验,其原理是以红色胶体金为标记物,原抗体通过渗滤在硝酸纤维素膜上逐步反应,阳性结果呈现红色斑点。该法具有简便、快速,敏感性和特异性均高等特点,检测制剂方便携带,适合现场检验。2014年,Heidari等^[31]使用 Dot-ELISA 和 ELISA 方法对比检测了 50 份肝片吸虫阳性血清、81 份非肝片吸虫阳性血清、150 份健康血清,结果显示, Dot-ELISA 检测结果灵敏度 100%, 特异性 92.2%, ELISA 检测结果为灵敏度 98%, 特异性 100%。2016年,李闵薇等^[32]利用重组蛋白羊肝片吸虫硫氧还蛋白过氧化物酶(thioredoxin peroxidase, TPx)为诊断抗原,建立羊肝片吸虫感染 Dot-ELISA 检测方法,用该方法对浙江海宁和桐乡 200 份羊血清进行检测,阳性率为 1.5%,但该实验因缺乏大量吸虫阳性血清,故不清楚是否与大片吸虫存在交叉反应。

4 总 结

肝片吸虫实验室检测方法的研究与建立一直在不断发展和进步。传统的诊断和检测方法主要依靠粪便检查,虽然病原学检测费时费力,但却最直观。所以在检测中依旧不可替代,仍是肝片吸虫确诊的金标准,但病原学需要检测人员有丰富的经验,易造成假阴性,并且不能及时在感染早期诊断出肝片吸虫病,造成环境污染。近些年来,分子生物学和免疫学的研究发展迅速,具有简便,快速,免疫性和特异性高等特点,分子生物学对实验的条件、环境及人员技能要求较高,但灵敏度和特异性高的特点,可分辨出不同种类的吸虫;免疫学方法方便、快捷,可结合 IgG 和 IgM 检测对吸虫早期、轻度、隐秘感染进行初步检测,为治疗提供参考依据。随着科学技术的发展,对于病原检测的特异性、灵敏度、低成本等需求越来越高,需要不断探索更快、更好的检测方法。目前,仍需要根据实验条件和环境条件,综合不同检测方法的特点以选择合适的检测方法,提高检测准确度。

参考文献:

[1] YAO J W, JIA T W. Global distribution and transmission of *Fasciola* [J]. Chinese Journal of Schistosomiasis Control, 2023, 34(6): 654-658.
[2] LALOR R, CWIKLINSKI K, CALVANI N E D, et al.

Pathogenicity and virulence of the liver flukes *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* that cause the zoonosis Fasciolosis [J]. Virulence, 2021, 12(1): 2 839-2 867.
[3] MAS-COMA S, VALERO M A, BARGUES M D. Fascioliasis [M]. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer New York, 2014: 77-114.
[4] 赵成全, 郭明佳, 李 伟, 等. 青海省部分地区藏羊肝片吸虫感染情况调查 [J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(3): 134-136.
[5] 周 磊. 青藏高原牦牛、藏羊肝片吸虫血清学调查及西藏螺内寄生虫鉴定 [D]. 西藏拉萨: 西藏大学, 2020.
[6] 段佳慧, 张 楠, 刘少雄, 等. 基于 Fh010935 蛋白的绵羊肝片吸虫感染间接 ELISA 检测方法的建立及初步应用 [J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(4): 406-409.
DUAN J H, ZHANG N, LIU S X, et al. Establishment and preliminary application of indirect ELISA method for *Fasciola hepatica* infection in sheep based on Fh010935 protein [J]. Journal of Pathogen Biology, 2022, 17(4): 406-409.
[7] HEIDARI H, ZAHIRI H R, GHAREKHANI J, et al. Comparison of Dot-ELISA and ELISA techniques for detection of *Fasciola hepatica* in sheep using excretory-secretory antigens, 2014.
[8] 范晓龙, 胡 冰. 武威市凉州区家畜包虫病流行病学调查报告 [J]. 畜牧兽医杂志, 2022, 41(4): 41-42.
FAN X L, HU B. Report on epidemiological investigation of livestock hydatid disease in Liangzhou district of Wuwei city [J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2022, 41(4): 41-42.
[9] ZÁRATE-RENDÓN D A, VLAMINCK J, LEVECKE B, et al. Comparison of kato-katz thick smear, mini-FLOTAC, and flukefinder for the detection and quantification of *Fasciola hepatica* eggs in artificially spiked human stool [J]. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2019, 101(1): 59-61.
[10] AI L, CHEN M X, ALASAAD S, et al. Genetic characterization, species differentiation and detection of *Fasciola* spp. by molecular approaches [J]. Parasites & Vectors, 2011, 4: 101.
[11] CANENE-ADAMS K. General PCR [J]. Methods in Enzymology, 2013, 529: 291-298.
[12] CASTILLA GÓMEZ DE AGÜERO V, LUKA J, GANDASEGUI J, et al. *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* coexistence in domestic ruminants in Nigeria; Application of a PCR-based tool [J]. Tropical Animal Health and Production, 2020, 52(6): 3 893-3 897.
[13] HEID C A, STEVENS J, LIVAK K J, et al. Real time quantitative PCR [J]. ACS Omega, 1996, 6(10):

- 986-994.
- [14] 王彩霞,林祥梅,吴绍强,等.牛羊肝片吸虫病实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 检验检疫学刊,2017,27(1):1-4.
WANG C X, LIN X M, WU SH Q, et al. Establishment of real time PCR method for detection of fasciolosis in bovine and sheep[J]. Journal of Inspection and Quarantine, 2017, 27(1):1-4.
- [15] SHI H Z, LI M W, HUANG X C, et al. Development of SYBR green real-time PCR for diagnosis of fasciolosis in sheep[J]. Veterinary Parasitology, 2020, 283: 109-193.
- [16] 梁子英,刘 芳.实时荧光定量 PCR 技术及其应用研究进展[J]. 现代农业科技,2020(6):1-3.
LIANG Z Y, LIU F. Research progress on real-time quantitative PCR technology and its application[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2020(6):1-3.
- [17] RATHINASAMY V, HOSKING C, TRAN L, et al. Development of a multiplex quantitative PCR assay for detection and quantification of DNA from *Fasciola hepatica* and the intermediate snail host, *Austropeplea tomentosa* in water samples[J]. Veterinary Parasitology, 2018, 259:17-24.
- [18] HEYDARIAN P, MAMAGHANI A J, HAJIALILO E, et al. Identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* using multiplex PCR technique[J]. Annals of Parasitology, 2023, 69(2):67-74.
- [19] LOBATO I M, O'SULLIVAN C K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2018, 98:19-35.
- [20] CABADA M M, MALAGA J L, CASTELLANOS-GONZALEZ A, et al. Recombinase polymerase amplification compared to real-time polymerase chain reaction test for the detection of *Fasciola hepatica* in human stool[J]. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2017, 96(2):341-346.
- [21] CHAOUCH M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An effective molecular point-of-care technique for the rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2[J]. Reviews in Medical Virology, 2021, 31(6): 2-215.
- [22] TRAN L, TOET H, BEDDOE T. Environmental detection of *Fasciola hepatica* by loop-mediated isothermal amplification[J]. PeerJ, 2022, 10:13 778.
- [23] 石 磊,王 曼,时国强,等.环介导等温扩增技术研究进展[J]. 河北大学学报(自然科学版),2021,41(5): 565-571.
SHI L, WANG M, SHI G Q, et al. Research progress of loop-mediated isothermal amplification technology[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2021, 41(5):565-571.
- [24] TABATABAEI M S, AHMED M. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)[J]. Methods in Molecular Biology, 2022, 2508:115-134.
- [25] MUNITA M P, REA R, MARTINEZ-IBEAS A M, et al. Comparison of four commercially available ELISA kits for diagnosis of *Fasciola hepatica* in Irish cattle[J]. BMC Veterinary Research, 2019, 15(1):414.
- [26] AGUAYO V, VALDES B, ESPINO A M. Assessment of *Fasciola hepatica* glutathione S-transferase as an antigen for serodiagnosis of human chronic fascioliasis[J]. Acta Trop, 2018, 186:41-49.
- [27] DRESCHER G, DE VASCONCELOS T C B, BELO V S, et al. Serological diagnosis of fasciolosis (*Fasciola hepatica*) in humans, cattle, and sheep: a meta-analysis[J]. Front Vet Sci, 2023, 10:1 252 454.
- [28] 王熙凤,孟庆玲,乔 军,等.肝片吸虫 CatB4 蛋白分子特征及其免疫原性分析[J]. 南方农业学报,2019,50(1):158-164.
WANG X F, MENG Q L, QIAO J, et al. Molecular characteristics and immunogenicity analysis of CatB4 protein of *Fasciola hepatica* [J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(1):158-164.
- [29] WANG X F, QIAO M L, ZHANG K, et al. Development and evaluation of a colloidal gold immunochromatographic assay based on recombinant protein CatL1D for serodiagnosis of sheep fasciolosis [J]. Journal of Helminthology, 2019, 94:98.
- [30] 段佳慧.绵羊肝片吸虫感染检测抗原的筛选及其免疫学检测方法的建立与应用[D]. 吉林:吉林大学,2023.
- [31] PAPPAS M G. Recent applications of the dot-ELISA in immunoparasitology [J]. Veterinary Parasitology, 1988, 29(2-3):105-129.
- [32] 李闵薇,陈学秋,杨 怡,等.基于重组蛋白 TPx 的羊肝片吸虫感染 Dot-ELISA 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报,2016,36(1):79-84.
LI M W, CHEN X Q, YANG Y, et al. Establishment of a dot-ELISA for detection of sheep *Fasciola hepatica* based on TPx recombinant protein[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2016, 36(1):79-84.