

[文章编号] 1005-6661(2010)06-0539-05

• 论著 •

日本血吸虫毛蚴侵袭前后湖北钉螺差异表达 cDNA文库的构建与分析

刘琴, 李石柱, 张仪, 周晓农*

[摘要] **目的** 构建湖北钉螺被日本血吸虫毛蚴侵袭前、后差异表达 cDNA 文库, 筛选湖北钉螺免疫相关分子, 为探讨病原与中间宿主的相互作用奠定基础。**方法** 提取被日本血吸虫毛蚴侵袭前、后湖北钉螺的头足部组织总 RNA, 纯化 mRNA, 反转录合成 cDNA。分别以被日本血吸虫毛蚴侵袭前湖北钉螺 (未处理组) 和被日本血吸虫毛蚴侵袭后湖北钉螺 (处理组) 的头足部组织作为检测方 (Tester) 和驱动方 (Driver), 利用 PCR 方法选择 cDNA 杂交试剂盒分别进行正向和反向抑制性消减杂交。将获得的正向抑制性消减杂交产物克隆入 pGEM-T 载体, 重组质粒转入 E. coli DH5 α , 对菌液用 PCR 法扩增鉴定其中的插入片段。随机抽取 354 个阳性克隆进行 DNA 序列分析, 将所得表达序列标签 (ESTs) 序列在线进行 BLAST 分析。**结果** 从正向文库随机挑取的 354 个阳性克隆中测得 350 个 ESTs 序列, 生物信息学分析发现了 34 个湖北钉螺新基因, 其中 1 个与已知基因部分同源。**结论** 成功建立了被日本血吸虫侵袭前、后湖北钉螺差异表达片段 cDNA 消减文库, 发现了湖北钉螺新基因, 为筛选与湖北钉螺天然免疫相关的分子、进一步探讨中间宿主与病原的相互作用及筛选血吸虫病传播阻断疫苗候选分子奠定了基础。

[关键词] 湖北钉螺; 日本血吸虫; 抑制性消减杂交; 差异表达 cDNA 文库

[中图分类号] R383.24 **[文献标识码]** A

Construction and analysis of differentially expressed cDNA library for *Oncomelania hupensis* pre- and post-exposed to miracidium of *Schistosoma japonicum*

Liu Qin, Li Shi-zhu, Zhang Yi, Zhou Xiao-nong*

National Institute of Parasitic Diseases Chinese Center for Disease Control and Prevention Key Laboratory of Parasite and Vector Biology Ministry of Health Shanghai 200025, China

* Corresponding author

[Abstract] **Objective** To construct a differentially expressed cDNA library of *Oncomelania hupensis* the intermediate host of *Schistosoma japonicum* for pre- and post-exposed to miracidium of *S. japonicum*, and sequentially to screen the immunity-related molecules and lay the foundation for studying the interaction between pathogen and intermediate hosts. **Methods** The total RNA samples were separately isolated from pools of head-foot tissues of *O. hupensis* which were respectively pre- and post-exposed to miracidium of *S. japonicum*, then mRNA were purified and the cDNA were reverse transcription. The head-foot tissues of *O. hupensis* which were pre- and post-exposed to miracidium of *S. japonicum* were acted as driver and tester respectively. And suppression subtractive hybridization (SSH) was performed by using the PCR-Select cDNA Subtraction kit. The forward subtracted cDNA was ligated into pGEM-T easy vector. Recombinant plasmids were transformed into competent *Escherichia coli* cells DH5 α and the inserted fragments were identified by Bacterium PCR. Three hundred and fifty-four positive clones randomly selected were for DNA sequence analysis and the obtained ESTs were analyzed using online BLAST sequence analysis. **Results** A total of 354 randomly selected positive clones from the forward library were sequenced and 350 valid ESTs were obtained. Thirty-four *O. hupensis* new genes were discovered by bioinformatics analysis of which one was homologous with known genes. **Conclusions** The subtractive cDNA library of differentially expressed fragments of *O. hupensis* for pre- and post-exposed to miracidium of *S. japonicum* are constructed and new genes of *O. hupensis* are discovered. This will lay the foundation for screening *O. hupensis* immune molecules related to the natural elements and further studies on the interaction between host and pathogen and screening of transmission-interrupted vaccine candidate.

[Key words] *Oncomelania hupensis*; *Schistosoma japonicum*; Suppression subtractive hybridization; Differentially expressed gene

[基金项目] 国家重大科技专项 (2008ZX10004-011); 上海市自然科学基金 (10ZR1433400); 中国博士后科学基金 (20070420422)

[作者单位] 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 (上海 200025)

[作者简介] 刘琴, 女, 博士, 副研究员。研究方向: 寄生虫及媒介生物分子生物学

* 通信作者 E-mail: xiaonongzhou1962@gmail.com

湖北钉螺是日本血吸虫的唯一中间宿主,在血吸虫病的流行与扩散中起着重要的作用^[1-4]。至今,对钉螺与日本血吸虫间的相容性研究较多,但主要着重于钉螺传播血吸虫病的作用方面^[5-10],而对钉螺天然免疫方面的研究尚少见报道。本研究构建了湖北钉螺被日本血吸虫毛蚴侵袭前、后头足部组织的差异 cDNA 文库,通过表达序列标签 (EST) 测序以及生物信息学分析鉴定出一批在钉螺被血吸虫侵袭前、后存在差异表达的基因。这将为从基因水平了解钉螺与日本血吸虫的相互关系,从而为制定适宜的防控钉螺策略、阻断血吸虫感染钉螺、控制血吸虫病传播提供参考依据。

材料与方法

1 湖北钉螺及处理

取经实验室驯养的湖北钉螺指名亚种安徽株 F2 代雌性钉螺 40 只,分成处理组和未处理组,每组 20 只,分别放入 24 孔培养板中,每孔 1 只。处理组取新鲜孵化的安徽株日本血吸虫毛蚴在显微镜下计数,每孔放入约 10 只毛蚴 (螺和毛蚴比为 1 : 10),然后加满脱氯水 (满而未溢);未处理组不加入毛蚴,直接加脱氯水。两组均置于 28~30℃ 白炽灯灯光照射下作用 6~8 h 后,收集开厩钉螺,立即置于解剖镜下解剖,收集雌性钉螺头足部组织,立即用于提取总 RNA,或立即冻存于 -80℃ 冰箱备用。毛蚴收集方法如下:将感染日本血吸虫安徽株的阳性钉螺常规法逸放并收集尾蚴^[1],以每只新西兰大白兔腹部贴皮感染 2 000 条尾蚴,43~45 d 后解剖,取肝脏,按常规法分离收集新鲜虫卵、孵化、收集毛蚴备用^[1]。

2 总 RNA 和 mRNA 的提取及质量分析

用总 RNA 提取试剂盒 (SV Total RNA Isolation System, 美国 Promega 公司) 提取日本血吸虫侵袭前及侵袭后钉螺头足部组织样品的 RNA,琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 是否存在降解,用 PolyATtract[®] mRNA 纯化试剂盒 (美国 Promega 公司) 从所提取的总 RNA 中分离纯化 mRNA;紫外分光光度计 (Ultrospec[®] 500/1100, 美国) 检测总 RNA 和 mRNA 浓度和纯度。

3 抑制消减杂交 (SSH) 技术

采用 PCR-Select[™] cDNA 消减试剂盒 (美国 Clontech 公司) 通过 SSH 技术构建消减文库,按照试剂盒说明书操作。首先分别取约 2 μg 毛蚴侵袭前、后湖北

钉螺的 mRNA 反转录成双链 cDNA,然后分别经 RsaI 酶切消化后纯化,加上接头 (Adaptor) 并分析接头的连接效率;以处理组头足部组织 cDNA 为试验方 (Tester),未处理组头足部组织 cDNA 为驱动方 (Driver),经过 68℃ 8 h 和 14 h 两轮消减杂交后,然后进行两轮抑制性 PCR,获得正向 SSH 产物。

4 消减后 PCR 产物的克隆

纯化消减后的 2 次 PCR 扩增产物,连接 pGEM-T 载体 (美国 Promega 公司),转化 E. coli DH5α,构建消减 cDNA 文库。5 溴-4 氯-3 吡啶半乳糖苷 (X-gal) 和异丙基-β-D 硫代半乳糖苷 (IPTG) 进行蓝白斑筛选,挑取白色菌落用抑制消减杂交中的巢式引物进行 PCR 扩增,观察是否有插入片段及插入片段大小。

5 阳性克隆的序列分析

通过 ABI377 自动测序仪测定随机挑取的阳性克隆子序列,基于已有钉螺数据的同源性 (使用 blast search tool) 编写的代码进行聚类。使用 BLASTx 程序将处理后的 EST 序列用 BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 在 GenBank/EMBL/DBJ 的 EST 数据库中,以及 GenBank/EMBL/DBJ/PDB 的非冗余性核酸数据库中分别进行同源性搜索,根据约束条件,提取注释信息,对钉螺基因信息进行注释。

结 果

1 总 RNA 和 mRNA 的定量和定性分析

用总 RNA 提取试剂盒和 mRNA 纯化试剂盒提取的总 RNA 和 mRNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值在正常范围内,表明所提取的总 RNA 和 mRNA 纯度高,没有 DNA 或蛋白污染 (表 1)。经琼脂糖凝胶电泳鉴定显示,所提取的总 RNA 完整,18 S 条带亮度显著高于 28 S 符合总 RNA 特征 (图 1)。对总 RNA 的定量与定性分析及对 mRNA 的定量分析均表明所提取的 mRNA 完整,质量良好,可用于构建 cDNA 消减文库。

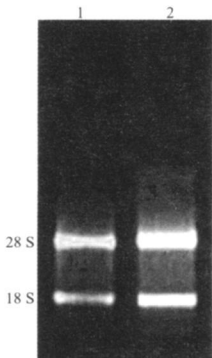
2 双链 cDNA 的合成及 RsaI 酶切

电泳结果显示,酶切前两种双链 cDNA 弥散条带介于 0.5~3.0 kb 之间,表明所制备的双链 cDNA 质量较好,提取的 mRNA 未降解;经 RsaI 酶切后, cDNA 片段大小降低,介于 0.2~3.0 kb 之间,集中分布在 0.5~1.0 kb 与预期一致,表明酶切完全 (图 2)。

表 1 毛蚴侵袭后湖北钉螺总 RNA 和 mRNA 定量分析结果

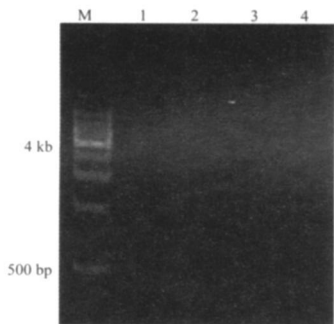
Table 1 Quantitative analysis of total RNA and mRNA of *O. hupensis* exposed and pre-exposed to miracidia of *S. japonicum*

检测内容 Examination content	未处理组钉螺组织 Snail tissues of untreated group		处理组钉螺组织 Snail tissues of treated group	
	总 RNA Total RNA	mRNA	总 RNA Total RNA	mRNA
	浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	吸光度 Absorbance A_{260}/A_{230}	浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	吸光度 Absorbance A_{260}/A_{230}
1	2.47	1.23	3.64	1.58
2	0.431	0.472	0.658	0.327
3	1.860	1.814	1.793	1.782



1 处理组湖北钉螺总 RNA; 2 未处理组湖北钉螺总 RNA
1 Total RNA of *O. hupensis* in treated group; 2 Total RNA of *O. hupensis* in untreated group

图 1 湖北钉螺总 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果
Fig 1 Results of total RNA in *O. hupensis* by agarose gel electrophoresis



M 1 kb Marker; 1 处理组湖北钉螺双链 cDNA; 2 处理组湖北钉螺双链 cDNA Rsa I 酶切; 3 未处理组湖北钉螺双链 cDNA; 4 未处理组湖北钉螺双链 cDNA Rsa I 酶切
M 1 kb Marker; 1 Double-strand cDNA of *O. hupensis* of the treated group; 2 Double-strand cDNA of *O. hupensis* of the treated group digested with Rsa I; 3 Double-strand cDNA of *O. hupensis* of the untreated group; 4 Double-strand cDNA of *O. hupensis* of the untreated group digested with Rsa I

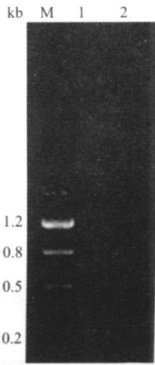
图 2 双链 cDNA 及 Rsa I 酶切结果
琼脂糖凝胶电泳图

Fig 2 Results of double-strand cDNA and corresponding Rsa I digestion by agarose gel electrophoresis

3 差异 cDNA 文库构建中两轮抑制 PCR 产物分析

文库构建中经 SSH 消减后 (经两轮抑制 PCR), cDNA 片段较消减前分布区域明显缩小, 片段长度明

显集中, 可见明显亮的条带 (图 3), 表明 cDNA 得到了较好的均衡和消减。



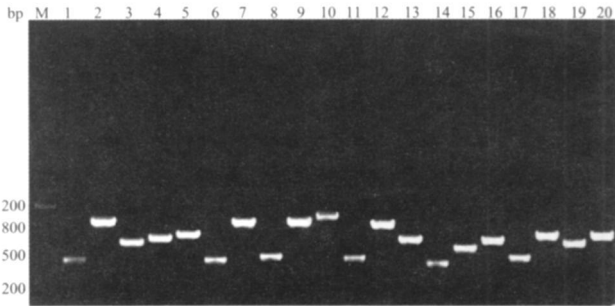
M 分子量标准; 1, 2 分别为正向和反向杂交后第二轮 PCR 扩增产物
M DNA Marker; 1, 2 Second PCR products after the forward and reverse hybridization respectively

图 3 第 2 轮 PCR 结果电泳图

Fig 3 Agarose electrophoresis of the second PCR result

4 抑制消减文库中差异片段的 PCR 鉴定

通过蓝、白斑筛选阳性菌落, 随机从差异 cDNA 文库中各挑取 382 个克隆, 进行 PCR 扩增, 其中 354 个克隆中有特异性条带, 阳性率为 92.7%。片段大小集中在 200~1 000 bp 之间 (图 4)。



M 分子量标准; 1~20 部分重组质粒 PCR 扩增产物
M DNA Marker; 1~20 PCR products of some recombinant plasmid

图 4 消减文库中部分克隆的 PCR 扩增

Fig 4 PCR amplification of some clones in subtraction library

5 阳性克隆的序列分析

通过 ABI377 自动测序仪,正向测定了 354 个阳性克隆插入片段的序列,其中载体序列为 4 个,序列质量为 99%。基于已有钉螺数据的同源性(使用 blast search tool 同源性 $\geq 90\%$)编写的代码进行聚类,其冗余率为 90.3%,其中 ESTs ≥ 50 的条数达到 166 条,占 47.4%;单个基因的 EST 仅为 9 条,占 2.6%,大部分序列均为冗余序列。结果表明,消减文库得到充分消减杂交(表 2)。利用 BLAST 软件与 GenBank 中的已知序列进行比较,仅 1 个基因与已知基因部分同源,其他 33 个基因均未注释到任何信息,为湖北钉螺新基因。

表 2 正向消减文库同源基因的分布
Table 2 Distribution of homologue of the normal subtracted library

基因所测 No	ESTs 数 ESTs in genes	基因数目 No genes	每组中的 ESTs 的数目 No ESTs(%)
	1	9	9(2.6%)
	2~5	12	32(9.1%)
	6~10	5	36(10.3%)
	10~50	6	107(30.6%)
	≥ 50	2	166(47.4%)
合计	Total	34	350(100%)

讨 论

生物共进化是指生物与生物之间互动而有相互适应的构造或行为衍生,是自然选择的结果,也是当今科学研究的热点^[11]。全面了解寄生虫与宿主的相互作用是研究生物进化的一个重大挑战。一方面,寄生虫产生有害物质,它们是宿主进化的主要动力之一;另一方面,寄生虫要与宿主共进化,以避免被消除^[12]。湖北钉螺是日本血吸虫的唯一中间宿主^[1]。毛蚴对螺类宿主类型的严格选择性以及血吸虫螺复杂的相容性,是螺类和血吸虫宿主长期相互作用和相互适应的结果,也是血吸虫和钉螺共进化的结果。由于日本血吸虫的生活史复杂,在毛蚴感染钉螺的过程中,钉螺与血吸虫间的相互作用关系复杂^[13]。一方面,日本血吸虫保持专性寄生于钉螺中间宿主体内,以完成生活史的一部分。其过程从自由游动的日本血吸虫毛蚴主动接近、钻入钉螺的外露软体组织开始。另一方面,螺类抵御外来生物入侵。湖北钉螺抗感染现象包括 2 种:一种是感染性钉螺自愈;另一种是血吸虫毛蚴侵入钉螺后,无法在钉螺体内正常发育,被钉螺体内的防御系统消灭^[1]。螺类抵御外来生物入侵的系统被称为“内部

防御系统”^[14]。该系统同时由细胞和体液因子参与,两者合作参与自身非自身物的识别和急性自身防御^[15-16]。因此,对作为中间宿主螺类的抗感染机制研究越来越引起研究者的兴趣,特别是随着分子生物学的发展,人们对其分子机制方面的研究越来越关注。

随着后基因组时代的到来,SSH 和 EST 日渐成为近年来应用较为广泛的分离鉴定差异表达基因的技术^[17-18]。SSH 利用 PCR 选择性的指数扩增不同丰度差异基因,使低丰度差异基因得到同等展示的机会。SSH 技术具有快速、灵敏、高效的优点,结合消减 cDNA 文库的高通量筛选,可以快速鉴定不同丰度差异基因。但是 SSH 不可以同时进行多样本的比较及所筛选出来的克隆尚存在一定的假阳性,也显示了其技术的不足^[19]。而 EST 是从 cDNA 文库中随机挑选单克隆进行测序所获得的短的 cDNA 序列片段^[20]。由于 EST 来源于生物体某个发育时期一个组织 mRNA 所构建的 cDNA 文库,因此 EST 能反映该组织中各基因在特定时期的表达。将所获得的 EST 序列与基因公共数据库中已知序列比较,不仅有助于从分子水平研究表达基因的生物学功能,也为发现新基因、寻找新的诊断抗原、药物靶点及候选疫苗分子提供了有效方法^[21]。将 SSH 技术与 EST 技术结合,能最大限度发挥各自的优势,并弥补其不足,从而使其成为理想的筛选差异表达基因的方法。

本研究构建了湖北钉螺被日本血吸虫侵袭前、后的正向和反向差异表达 cDNA 文库。消减效率分析表明,同源基因经过消减杂交后得到了有效扣除,消减效率较高;重组比率及插入片段长度分析结果表明,正向消减文库的重组比率为 96.5%,且 95% 的插入片段 >500 bp;雄虫消减文库的重组比率为 92.6%,且 75% 以上的插入片段 >500 bp。结果表明,本研究所构建的差异消减文库质量较高。

本研究中将 SSH 与 EST 两种技术有效结合用于筛选湖北钉螺被日本血吸虫侵袭前后差异表达分子。基因冗余性分析结果表明,其冗余率为 90.3%,文库中的 cDNA 得到了良好的均衡和消减。

在本研究中,利用差异表达文库 EST 数据与整理的本地数据库(tigr ReSeq, GenBank 及各个大学的发表数据)进行同源搜索,对其进行注释,结果表明,本研究获得的基因很少与已知数据有同源性;进一步与 ReSeq 数据库的数据做远源的同源搜索,也显示大多数基因没有与已知基因的同源性;提示,本研究获得的差异表达文库中的大多数基因为湖北钉螺特有基因。因 tigr ReSeq, GenBank 3 大数据库中湖北钉螺的基因信息有限(查找 3 大数据库,仅有部分线粒体基因序

列),而当前对光滑双脐螺研究所提交的基因组数据也有限,所以,大多数的基因为湖北钉螺新基因,因而也无法注释其功能和生物学特性。这些均有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1]周晓农.实用钉螺学[M].北京:科学出版社,2005:219-242.
- [2]周晓农,姜庆五,吴晓华,等.我国控制和消灭血吸虫病标准的作用与演变[J].中国血吸虫病防治杂志,2007,19(1):1-4.
- [3]林丹丹,汪世平,姜庆五,等.我国血吸虫病疫情控制标准技术指标的探讨[J].中国血吸虫病防治杂志,2007,19(1):5-8.
- [4]张世清,朱荫昌,汪天平,等.我国血吸虫病传播阻断标准技术指标的探讨[J].中国血吸虫病防治杂志,2007,19(1):9-11.
- [5]王晓勤,毛守白.螺与血吸虫的关系[J].国外医学:寄生虫病分册,1989,9(2):245-250.
- [6]Van der Knaap WPW, Loker ES. Immune mechanisms in trematode-snail interactions[J]. Parasitol Today 1990, 6(6): 175-182.
- [7]张红梅,诸葛洪祥,王玉芳,等.钉螺血淋巴细胞及其功能的研究[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2007,25(2):141-144.
- [8]覃翠,杨建明,肖少玉,等.钉螺血淋巴细胞酸性磷酸酶活性的研究[J].中国公共卫生,2005,21(6):679-680.
- [9]刘凌鹏,肖丽波,何昌浩,等.钉螺感染日本血吸虫后酸性磷酸酶含量变化[J].中国血吸虫病防治杂志,2008,20(5):367-368.
- [10]赵磊,周书林,唐小牛.湖北钉螺酚氧化酶组织化学定位进一步研究[J].中国血吸虫病防治杂志,2008,20(5):377-379.
- [11]Roger E M, ita G, Moné Y, et al. Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni*

- model: new candidates identified by a global comparative proteomics approach [J]. Mol Biochem Parasitol 2008, 157(2): 205-216.
- [12]Roger E, Goubal B, Grunau C, et al. Expression analysis of highly polymorphic mucin proteins (Sn pmMuc) from the parasite *Schistosoma mansoni* [J]. Mol Biochem Parasitol 2008, 157(2): 217-227.
- [13]周晓农.钉螺生物学研究进展[J].中国血吸虫病防治杂志,1994,6(1):25-30.
- [14]Lockyer AE, Jones CS, Noble LR, et al. Use of differential display to detect changes in gene expression in the intermediate snail host *Biomphalaria glabrata* upon infection with *Schistosoma mansoni* [J]. Parasitology 2000, 120 (Pt 4): 399-407.
- [15]孙敬峰,吴信忠.贝类血细胞及其免疫功能研究进展[J].水生生物学报,2006,30(5):601-606.
- [16]Lockyer AE, Spinks J, Noble LR, et al. Identification of genes involved in interactions between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* by suppression subtractive hybridization [J]. Mol Biochem Parasitol 2007, 151(1): 18-27.
- [17]蔡磊,赵青川.差异表达基因的几种筛选方法[J].第四军医大学学报,2007,28(3):682-684.
- [18]田小军,薛燕.表达序列标签在寄生虫功能基因组学研究中的应用[J].中国病原生物学杂志,2008,3(3):231-233.
- [19]周艳宏,李桂源.抑制消减杂交与基因芯片技术及其联合应用[J].国际肿瘤学杂志,2006,33(7):481-483.
- [20]张新.表达序列标签(EST)的研究现状[J].黑龙江医学,2008,32(9):672-678.
- [21]刘稳升,吴忠道.表达序列标签大规模序列分析策略及方法[J].国际医学寄生虫病杂志,2007,34(3):139-145.

[收稿日期] 2010-06-28

[编辑] 汪伟

(上接第 538 页)

2.2 血吸虫感染情况 1 986名外来流动人员经血吸虫 ELISA 检测,发现阳性 26例,血检阳性率为 1.31%;男性和女性阳性率分别为 1.52%(18/1182)和 1.00%(8/804),两者差异有统计学意义($\chi^2=0.96$, $P>0.05$)。不同年龄组间的血检阳性率以>50岁组最高,为 4.11%(3/73);<20岁组最低,为 0.59%(1/169);两者差异有统计学意义($\chi^2=7.80$, $P<0.05$)。不同职业间以民工最高,为 2.47%(16/647)。来自血吸虫病非流行区、传播控制流行区和未控制流行区者的血检阳性率分别为 0.91%(8/875)、1.07%(6/560)和 2.18%(12/551)($\chi^2=4.00$, $P<0.05$)。26例血检阳性者经 Kato-Katz法检查均未发现血吸虫卵,但对其进行个案调查发现,其中 8名分别来自安徽、湖北、湖南和四川等血吸虫病流行区的流动人员曾有血吸虫病病史。

3 讨论

三峡建坝后,库区生态环境和社会因素等将向有利于钉螺孳生的方向转变,从而可能使库区成为潜在的血吸虫病流行区^[1,2,7]。本次调查发现,外来流动人员血清学阳性率为 1.31%,虽未发现血吸虫病病原学阳性者,但其中有 8例为来自血吸虫病疫区的历史病人,表明流动人员有可能或已将血吸虫病传染源带入三峡库区。同时调查发现,三峡库区外来流动人口主要来自湖北、湖南、四川省,因此,来自血吸虫病流行区、尤

其是来自三峡库区周边省份的流动人口可能是血吸虫病传染源的重要来源之一,应作为今后三峡库区血吸虫病防控监测的重点。同时针对这类人群,还应加强管理,开展相应的健康教育,提高广大流动人口的血防意识,及时发现和治疗传染源,防止血吸虫病在三峡库区流行。

[参考文献]

- [1]王汝波,郑江.三峡水利工程与中国血吸虫病的流行[J].中国血吸虫病防治杂志,2003,15(1):71-74.
- [2]魏凤华,王汝波,徐兴建,等.三峡建坝后血吸虫病传播危险因素的研究:库区生态环境变化对钉螺孳生可能性研究[J].中国血吸虫病防治杂志,2007,19(2):81-85.
- [3]吴成果,罗兴建,肖邦忠,等.2002—2007年三峡库区血吸虫病监测[J].中国血吸虫病防治杂志,2008,20(5):330-331.
- [4]吴成果,罗兴建,周新,等.2006年重庆市国家血吸虫病监测点疫情监测[J].中国血吸虫病防治杂志,2008,20(1):58-60.
- [5]余凤苹,望开宇,崔雪峰,等.2007年宜昌市三峡库区血吸虫病监测[J].中国血吸虫病防治杂志,2009,21(2):101-106.
- [6]吴晓华,许静,李石柱,等.2008年全国血吸虫病潜在流行区监测预警报告[J].中国血吸虫病防治杂志,2009,21(5):353-357.
- [7]许发森,文松,钱晓洪,等.三峡库区社会因素对血吸虫病流行的影响[J].实用寄生虫病杂志,1999,7(2):74-75.

[收稿日期] 2010-07-23

[编辑] 邓瑶