

贝类派琴虫实时荧光定量 PCR 检测方法的建立和应用

吴绍强¹ 李海艳^{1,2} 林祥梅^{1*} 郑腾³ 李西峰⁴
刘建¹ 梅琳¹ 韩雪清¹ 贾广乐¹

(¹ 中国检验检疫科学研究院, 北京 100029)

(² 内蒙古农业大学, 呼和浩特 010018)

(³ 福建出入境检验检疫局, 福州 350003)

(⁴ 黄岛出入境检验检疫局, 青岛 266555)

摘要 选择派琴虫保守的核糖体 DNA ITS-2 区域设计引物和 TaqMan 探针, 通过对反应体系和反应条件进行优化, 建立了实时荧光定量 PCR 检测派琴虫的方法。所构建方法检测质粒模板 DNA 的动态范围为 $2.6 \times 10^1 \sim 2.6 \times 10^7$ 拷贝, 敏感度可检测到 26 拷贝质粒 DNA, 而且与包拉米原虫、隐孢子虫等其他寄生性原虫无交叉反应, 也不受贝类组织 DNA 的干扰。利用本研究所建立的方法对来自我国山东、福建等不同沿海海域的 30 份贝类样品进行检测, 检出阳性样品 3 份。研究表明, 本研究所构建的派琴虫实时荧光定量 PCR 检测方法具有快速、灵敏和特异等优点, 可满足国内养殖场及进出口水生动物携带派琴虫的检测需要。

关键词 派琴虫 贝类 实时荧光 PCR 检测

中图分类号 S944.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)05-0058-06

Establishment and application of real time PCR method for detection of *Perkinsus* sp. in bivalves

WU Shao-qiang¹ LI Hai-yan^{1,2} LIN Xiang-mei^{1*} ZHENG Teng³
LI Xi-feng⁴ LIU Jian¹ MEI Lin¹ HAN Xue-qing¹ JIA Guang-le¹

(¹ Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029)

(² Inner Mongolia Agricultural University, Huhchaote, 010018)

(³ Fujian Entry-exit Inspection and Quarantine, Fuzhou 350003)

(⁴ Huangdao Entry-exit Inspection and Quarantine, Qingdao 266555)

ABSTRACT *Perkinsus* sp. are parasites for marine bivalves. They can have severe pathogenic effect on their hosts and cause significant economic losses to the bivalve culture industry. To facilitate rapid and sensitive diagnosis of *Perkinsus* sp., the real time TaqMan PCR method was developed to detect *Perkinsus* sp. infection in oysters and other bivalves. The primers and TaqMan probe were designed and chosen to amplify the conserved internal transcript spacer 2 (ITS-2) segment of genus *Perkinsus* sp. ribosomal DNA. The sensitivity and specificity of the

国家科技支撑计划(2006BAD05A14)和国家质检总局科研基金(2005IK038)共同资助

* 通讯作者, E-mail: xiangmei@lin@yahoo.com.cn, Tel: (010)64912741

收稿日期: 2008-09-02; 接受日期: 2008-11-28

作者简介: 吴绍强(1970-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事动物检验检疫研究, E-mail: sqwu@sina.com, Tel: (010)64927408

应用

和反
A 的
隐孢
时来
研究
及进

developed method were examined using the plasmid containing the targeted ITS-2 fragment as template. The online BLAST analysis showed that the primers and probe were specific enough to distinguish *Perkinsus* sp. from *Bonamia* sp. and other protistan parasites while not affected by bivalve tissue DNA at the same time. The dynamic range of the developed method was between 2.6×10^1 and 2.6×10^7 copies, meaning that the target DNA could be reliably detected and quantified for plasmid template DNA at a concentration as low as 26 copies. Thirty samples, collected from different sea areas of China, were tested for *Perkinsus* infection and 3 samples, collected from Shandong and Fujian coastal areas respectively, gave positive results. This test result was confirmed by traditional FTM culturing method. In conclusion, the real time PCR method is rapid, sensitive and specific for *Perkinsus*, and can be used to inspect Perkinsosis in the farm and for quarantine use.

KEY WORDS *Perkinsus* sp. Bivalve Real time PCR Detection

派琴虫 *Perkinsus* sp. 是影响世界贝类养殖业发展的主要病原, 为 OIE 规定的必报水生动物疫病之一。1946 年派琴虫最初在美洲牡蛎 *Crassostrea virginica* 体内发现, 当时曾引起美国路易斯安那州的墨西哥海湾的大批牡蛎死亡。从缅因州到墨西哥湾的大西洋沿岸海域的美洲牡蛎都曾有派琴虫病发生的报道, 美国亚特兰大中部地区多次严重的暴发派琴虫病, 死亡率高达 95%。1995 年, 派琴虫病致使大西洋伊伯利亚海岸、地中海海岸的马尼拉蛤仔大量死亡。1998 年, 派琴虫病导致日本南部和北部海岸的马尼拉蛤仔、菲律宾蛤仔及韩国南北半岛人工养殖和野生的马尼拉蛤仔大量的死亡, 造成严重的经济损失。

1997 年我国在栉孔扇贝、虾夷扇贝、皱纹盘鲍和菲律宾蛤仔体内检测到派琴虫。美国 2005 年也从中国广西北海进口牡蛎中检出派琴虫。梁玉波(2005)采用巯基醋酸盐培养基(Fluid thioglycollate media, FTM)培养的方法, 对黄海北部 3 个海域的菲律宾蛤仔的派琴虫感染状况进行周年调查的结果表明, 除 3 月和 6 月份的感染率分别为 95% 和 90% 之外, 其他月份感染率均为 100%。由此可见, 派琴虫已经成为影响我国贝类养殖业发展的主要病原之一。

目前, Ray(1996)报道采用 FTM 培养派琴虫休眠孢子的方法被广泛应用于派琴虫的检测上, 派琴虫滋养体经培养后体积增大、细胞壁增厚, 而且不繁殖, 是一种传统有效的定量检测派琴虫的方法。但是该培养法只能将派琴虫培养成休眠孢子阶段才能检测到, 而且整个过程耗时长达 7 d, 敏感性较低, 只有当每克组织内原虫数量高于 1 000 个时方可检出。建立一种敏感、快速的检测方法是目前我国派琴虫防控工作的当务之急。

近年来, 荧光实时定量技术在水产养殖研究中的应用越来越重要(任伟成等 2007; 周 优等 2008)。本研究在派琴虫 FTM 培养及分离的基础上, 也选择敏感性较高的荧光 PCR 技术, 建立派琴虫的检测方法, 以为我国贝类产品的检测提供技术支持, 从而满足国内养殖场及进出口水生动物携带派琴虫的检测需要。

1 材料与方 法

1.1 材 料

在 4~5 月期间(常亚青等 2007), 课题组从辽宁、山东和福建等海域采集菲律宾蛤仔、近江牡蛎、太平洋牡蛎、文蛤、紫石房蛤、毛蛤、青蛤、海湾扇贝和虾夷扇贝等贝类样品。

对照样品: 刺激隐核虫 *Cryptocaryon irritans* DNA、微孢子虫 *Microsporidians* DNA 由中山大学李安兴教授惠赠; 微小隐孢子虫 *Cryptosporidium parvum* DNA 由中国科学院动物研究所何宏轩研究员惠赠; 牡蛎包拉米虫 *Bonamia Ostreae* DNA 由法国软体动物疾病参考实验室的 Isabelle Arzul 教授惠赠。

1.2 方 法

e patho-
industry.
method
ners and
spacer 2
y of the

1.2.1 感染派琴虫阳性样品的鉴定

按照 Ray(1996)报道的 FTM 培养方法修改后进行。抽取来自山东的菲律宾蛤仔 30 只,分别置于灭菌的研钵,研磨至 0.1 mm^3 左右,置于 10 ml 离心管中,加 5 ml 巯基乙酸盐培养基 (Thioglycolate Broth with Resazurine, Fluka, 90404),加 $250\mu\text{l}$ 2.5% 的氯霉素摇匀,将 1% 制霉菌素 1ml 覆盖在表面,盖好盖子,暗室中培养 5~7 d。4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加 6 ml 2 mol/L NaOH,涡旋混匀后置于 $55\text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱内消化过夜,4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加 2 ml ddH₂O,4 000 r/min 离心,弃上清液,重复上述步骤 2~4 次,将沉淀用 ddH₂O 定容至 2ml,混匀后,吸取 $30\mu\text{l}$ 于载玻片上,加盖玻片后,在显微镜下观察,如果观察到派琴虫的休眠孢子,可鉴定为阳性。

1.2.2 阳性克隆质粒的构建

1.2.2.1 病料组织基因组 DNA 提取

取经 FTM 培养表明,感染派琴虫的菲律宾蛤仔的鳃组织 25 mg,按试剂盒(QIAGEN, 69506)说明提取基因组 DNA, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.2.2.2 基因克隆及阳性质粒的构建

以病料组织基因组 DNA 为模板,采用梁玉波(2005)的方法派琴虫特异性引物 AF 和 AR 进行 PCR,预期扩增片段长度为 649bp,PCR 产物电泳后,切胶回收(OMEGA, D2500-01)目的条带并克隆到 pGEM-T 载体(Promega, A3610),转化到大肠杆菌 *E. coli* JM 109 感受态细胞(TaKaRa, D9052, 蓝白斑筛选、PCR 鉴定获得含目的基因片段的重组质粒并纯化(OMEGA, D6943-01)后 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 派琴虫实时荧光 PCR 检测方法的建立

1.2.3.1 引物设计与合成

选择派琴虫的核糖体 DNA 序列中比较保守的 ITS 2 区域,利用软件 Beacon Designer 7.0 设计引物和探针序列。上游引物: 5'-GAAGAATGGCGTGATCAAGGAAC-3'; 下游引物: 5'-TGCAAGGCTATAATCTCGTATTGTAG-3',引物经 BLAST 分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)确定为派琴虫属的特异性引物,预期 PCR 扩增片段为 126 bp。TaqMan 荧光探针: 5'-CAACACAGTCCGACTTGCGAG-CATCCAA-3'。其中,5'端标记有荧光报告基团 6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein, FAM),3'端标有荧光淬灭基团 6-羧基四甲基诺丹明(6-carboxy-N, N, N', N'-tetramethylrhodamine, TAMRA)。引物和探针合成(TaKaRa)后,均稀释为 $10\mu\text{mol/L}$, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存备用。

1.2.3.2 派琴虫实时荧光 PCR 检测方法的建立与优化

以派琴虫阳性克隆质粒 DNA 作为模板,建立派琴虫荧光 PCR 检测方法,并对反应体系(Mg^{2+} 、dNTP 和 rTaq 等的用量)和反应条件进行优化。

1.2.3.3 派琴虫实时荧光 PCR 检测方法敏感性确定

用 TE 缓冲液(pH 值 8.0)依次将质粒 DNA 进行 10 倍梯度稀释至 1.3×10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 和 10^2 以及 13 拷贝/ μl ,采用 1.2.3.2 优化的派琴虫荧光 PCR 检测方法进行试验,以确定所建立方法的敏感性。

1.2.3.4 派琴虫实时荧光 PCR 检测方法特异性的检测

按照方法 1.2.2.1 中提取 DNA 的方法,提取派琴虫感染阳性病料组织 DNA 分别以刺激隐核虫 DNA、微孢子虫 DNA、微小隐孢子虫 DNA、牡蛎包拉米虫 DNA 和未感染牡蛎组织 DNA 作对照,同时以灭菌蒸馏水作为阴性对照,以构建的派琴虫阳性质粒作为阳性对照,检测所建立的派琴虫荧光 PCR 检测方法的特异性。

1.2.4 派琴虫实时荧光 PCR 检测方法的应用

对分别来自辽宁、山东和福建等地的近江牡蛎、太平洋牡蛎、菲律宾蛤仔、文蛤、紫石房蛤、毛蛤、青蛤、海湾扇贝和虾夷扇贝等 30 份贝类样品,选取相关组织提取 DNA 后以蒸馏水作为阴性对照、阳性质粒 DNA 作为阳性对照,利用优化的荧光 PCR 方法进行派琴虫检测。

2 结果

2.1 感染派琴虫阳性样品的鉴定

根据 Ray(1952)报道的 FTM 培养方法,将培养、分离出来的派琴虫休眠孢子在显微镜下观察发现,派琴虫的休眠孢子呈圆形,卢格氏碘液染色后为蓝黑色,直径大多在 $30\sim 80\ \mu\text{m}$ (如图 1),培养所选取的 30 只菲律宾蛤仔都不同程度的感染了派琴虫病,感染率高达 100%。

2.2 克隆及测序结果

将克隆的阳性质粒送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序,结果经在线 BLAST 分析,与 *Perkinsus olseni* (*Perkinsus atlanticus*)、*Perkinsus* sp. 相关基因的序列一致性达 100%,与 *Perkinsus marinus* 相关基因的序列一致性达 80%。提取质粒,用核酸蛋白测定仪(NanoDrop ND-100)进行测定,拷贝数为 1.30×10^8 拷贝/ μl , $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.3 派琴虫实时荧光 PCR 检测方法的建立和优化

对荧光 PCR 反应体系和反应条件进行优化,反应体系组成为($25\ \mu\text{l}$):DNA 模板 $2\ \mu\text{l}$ 、 $10\times$ buffer(不含 Mg^{2+}) $2.5\ \mu\text{l}$ 、等体积混合的上下游引物($10\ \mu\text{mol/L}$) $1.5\ \mu\text{l}$ 、荧光探针($10\ \mu\text{mol/L}$) $0.5\ \mu\text{l}$ 、 MgCl_2 ($25\ \text{mmol/L}$) $5\ \mu\text{l}$ 、dNTP($2.5\ \text{mmol/L}$) $2\ \mu\text{l}$ 、rTaq DNA 聚合酶($5\ \text{U}/\mu\text{l}$) $0.2\ \mu\text{l}$ 和灭菌 ddH_2O 补充至 $25\ \mu\text{l}$ 。

荧光 PCR 反应条件为: $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 15 s, $57\ ^\circ\text{C}$ 退火 30 s 扩增 40 个循环,每个循环的第 2 步反应结束时检测荧光。

2.4 派琴虫荧光 PCR 检测标准曲线的绘制及敏感性和特异性试验

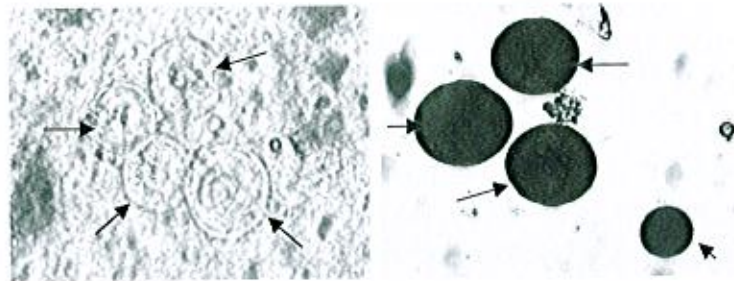
以临界循环数(Threshold cycle, Ct)为 y 轴,对应的质粒 DNA 标准品拷贝数的对数为 x 轴,制作标准曲线(图 2),得到的标准曲线扩增效率为 91.9%,斜率为 -3.533 ,反应的相关系数为 0.998。由敏感性试验(图 3)可知,荧光定量 PCR 反应检测的灵敏度为 26 个拷贝的质粒 DNA,其对应的 Ct 值为 33.38,且扩增曲线为典型的 S 型曲线。特异性试验表明,本研究所建立的派琴虫荧光 PCR 检测方法与其他水生动物组织及原虫无交叉反应(图 4),表明所设计的引物及 Taqman 探针能够满足派琴虫特异性检测的需要。

2.5 检测

对分别来自辽宁、山东和福建等地的 30 份贝类样品,进行荧光 PCR 检测,检测到 3 份阳性样品,分别为来自辽宁的菲律宾蛤仔(1)、福建的菲律宾蛤仔(2)以及来自福建的毛蛤(3),阳性检出率为 10%(图 5),所有阳性样品的检测结果均采用 FTM 培养方法进行了证实。

3 讨论

本研究中,采用菲律宾蛤仔全组织 FTM 培养的方法,成功培养出了派琴虫的休眠孢子。根据 Almeida 等(1999)报道将菲律宾蛤仔全组织用 FTM 培养基培养敏感性为 95%,对菲律宾蛤仔的鳃组织进行 FTM 培养的敏感性为 80%,分析原因可能与派琴虫不仅可以寄生在蛤仔的鳃组织,还可以寄生在其他组织有关。比较而言,组织全培养的敏感性较高,因此,本试验将菲律宾蛤仔去壳后,直接在 FTM 培养基中培养,成功培养获得了派琴虫,也为下一步建立派琴虫的分子生物学检测方法筛选到了阳性病料。本研究结果表明,试验采用的



左图中箭头所指为未染色的派琴虫休眠孢子,右图中为经卢格氏碘液染色后的派琴虫休眠孢子

The Lugol's solution stained parasites (right) and unstained ones (left) are shown with arrows

图 1 FTM 培养派琴虫的显微镜检查结果($\times 200$)

Fig. 1 Microscopic examination of *Perkinsus* sp. after FTM culture($\times 200$)

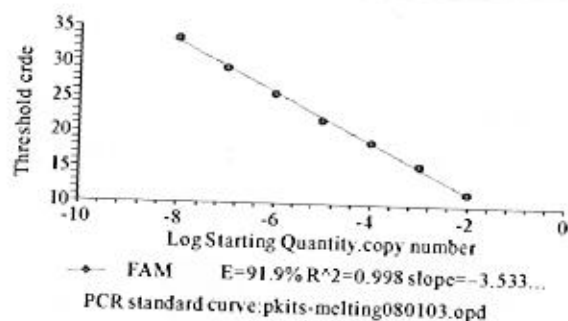


图2 派琴虫荧光 PCR 检测方法的标准曲线

Fig. 2 Dynamic range of real time PCR in detecting *Perkinsus*

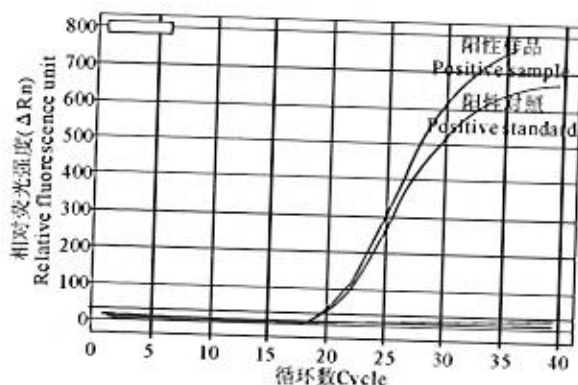
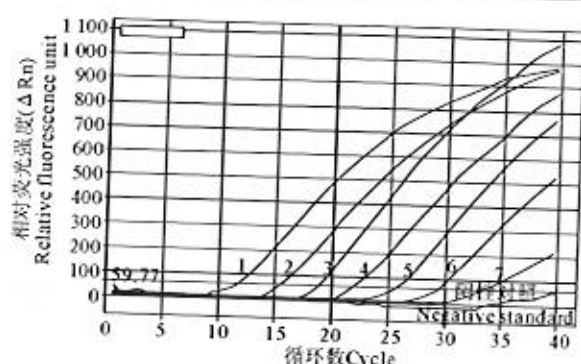


图4 派琴虫荧光 PCR 检测方法特异性试验

Fig. 4 Determination of the specificity of the developed *Perkinsus* real-time PCR detection method



曲线1-7分别为以 2.6×10^7 拷贝的10倍比稀释的质粒DNA作为模板

Plot 1-7 correspond to 2.6×10^7 copies of serial 10 fold dilutions of plasmid DNA as template

图3 荧光 PCR 检测派琴虫质粒模板DNA的敏感性试验

Fig. 3 The detection sensitivity of real time PCR using plasmid template containing targeted *Perkinsus* fragment

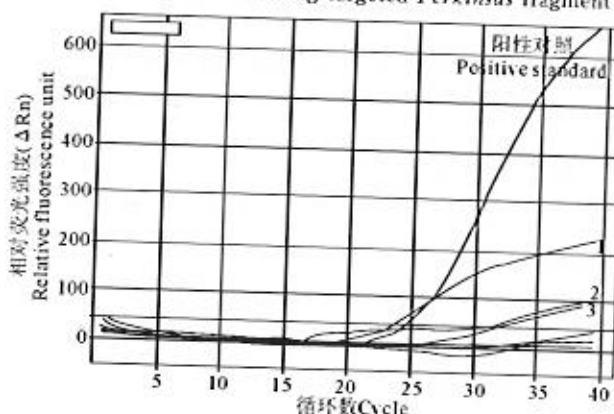


图5 荧光 PCR 检测样品中派琴虫结果

Fig. 5 Result of the *Perkinsus* contamination test using developed real-time PCR method

30只菲律宾蛤仔都不同程度的感染了派琴虫,感染率高达100%,这与梁玉波(2005)报道派琴虫的感染率是一致的,这也说明采用FTM培养基培养派琴虫是一种检测派琴虫的有效方法。FTM培养基法可以用显微镜直接观察到虫体,操作简单方便,但整个检测过程耗时需4~5d的时间,不利于快速检测派琴虫病。

近年来,为了提高派琴虫的检出率,科研人员建立了实时定量PCR检测派琴虫的方法。其中,Sybr Green I染料法荧光PCR检测海水中派琴虫的敏感性可达到 3.3×10^2 细胞,TaqMan探针荧光PCR检测法的敏感性为31拷贝NTS(非转录间隔区)DNA。本研究中,采用自主设计的引物及TaqMan探针,所建立的派琴虫荧光PCR检测方法的敏感性达到26拷贝质粒DNA,不但敏感性得到了提高,而且所构建的质粒DNA比文献所采用的基因组DNA更加稳定、易于保存,可以满足实验室长期检测、监测中对阳性对照样品的需要。

该试验在提取派琴虫组DNA时,应用了DNA提取试剂盒,根据说明,每次只能取病料25mg。为了更大程度的检测到派琴虫病原,提高所建立的派琴虫实时荧光PCR检测方法的敏感性,选取菲律宾蛤仔的鳃组织作为试验材料,这与Alderman等(1969)、Casas等(2002)以及梁玉波(2005)的方法是一致的。Alderman等(1969)在研究葡萄牙牡蛎感染派琴虫的病理变化时发现,牡蛎的鳃组织最易感染派琴虫的滋养体。Casas等(2002)发现在 *P. olseni*、*P. atlanticus* 轻度感染毯壳蛤 *T. decussatu* 时,派琴虫是通过鳃和唇瓣触角进入到寄主体内的。梁玉波(2005)在研究我国菲律宾蛤仔感染派琴虫的病理变化时指出,蛤仔的鳃组织、外套膜、消化腺、水管和闭合肌都会有不同程度的感染。其中,感染派琴虫滋养体较为严重的组织为蛤仔的鳃和外套膜。

随着现代科技的发展,利用核糖体 DNA 对寄生虫进行分类,近年来已经成为国际上的研究热点。Holmdahl 等(1994)报道,原生动物的 rRNA 基因上两个内部转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)碱基序列具有很强的变异性,是鉴定原生动物的可靠依据。迄今为止,人们发现的派琴虫已有 8 种之多,在我国分布较广、影响较大的为 *P. olseni*(或 *P. atlanticus*)。本研究选择在派琴虫 ITS2 高度保守区设计引物,BLAST 分析表明可扩增出 *P. olseni* 和 *P. marinus* 等派琴虫的相关基因,说明设计的引物在派琴虫属内有一定程度的通用性,这在尚未明了我国海域中是否还存在其他种类派琴虫的情况下,有利于尽可能的检获派琴虫病原。同时,本研究选用荧光 PCR 技术进行派琴虫的检测,敏感度较高(达 26 拷贝质粒 DNA)、特异性强,与刺激隐核虫、微孢子虫、微小隐孢子虫和牡蛎包拉米虫等其他水生动物常寄生性原虫无交叉反应,可极大满足进出口贝类样品快速检疫的需要。

实时荧光 PCR 方法检测 30 份贝类样品中,共有两份菲律宾蛤仔分别来自辽宁和福建,全都检测到了派琴虫,福建的毛蛤样品中也检测到了派琴虫,而来自这些地方的近江牡蛎、太平洋牡蛎、菲律宾蛤仔、文蛤、紫石房蛤、毛蛤、青蛤、海湾扇贝和虾夷扇贝等其他贝类则未感染派琴虫病,这说明在我国菲律宾蛤仔是派琴虫病的主要宿主,其他贝类是否也能感染派琴虫病,还需要通过大量的样品检测才能证实。

参 考 文 献

- 任伟成,王崇明,李 轶. 2007. 荧光实时定量技术及其在水产养殖研究中的应用. 海洋水产研究, 28(6): 97~103
- 张喜昌,梁玉波,杨 波,王立俊,卞正和. 2001. 海产贝类柏金虫病害的研究进展. 海洋环境科学, 20(2): 76~80
- 周 优,岳志芹,梁成珠,徐 彪,朱来华,高宏伟,孙 敏,刘 荻,汪东风. 2008. 常规 PCR、实时定量 PCR 检测传染性皮下及造血器官坏死病毒的效果分析. 海洋水产研究, 29(2): 97~103
- 梁玉波. 2005. 菲律宾蛤仔体内寄生柏金虫的研究. 见: 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士论文
- 常亚青,王庆志,宋 坚,曹学彬,李石磊. 2007. 黄渤海部大连沿岸虾夷扇贝天然苗采集技术研究. 海洋水产研究, 28, (6): 39~44
- Alderman, D. J., and Gras, P. 1969. "Gill Disease" of Portuguese oysters. Nature, 224: 616~617
- Almeida, M., Berthe, F., Thebault, A., and Dinis, M. T. 1999. Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsia) in clams *Ruditapes decussatus*. Aquaculture, 177: 325~332
- Audemard, C., Reece, K. S., and Burreson, E. M. 2004. Real-time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. Appl. Environ. Microbiol. 70(11): 6 611~6 618
- Bushek, D., Ford, S. E., and Allen, J. S. K. 1994. Evaluation of methods using Rays fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Annu. Rev. Fish Dis. 4: 201~217
- Casas, S. M., La Peyre, J. F., Reece, K. S., Azevedo, C., and Villalba, A. 2002b. Continuous in vitro culture the carpet shell clam *Tapes decussatus*, protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. Dis. Aquat. Org. 52: 217~231
- Casas, S. M., Villalba, A., and Reece, K. S. 2002a. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. Dis. Aquat. Org. 50: 51~65
- Choi, K. S., and Park, K. I. 1997. Report on the occurrence of *Perkinsus* spp in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum* in Korea. Aquaculture, 10: 227~237
- Hamaguchi, M., Suzuki, N., Usuki, H., and Ishioka, H. 1998. Perkinsus protozoan infection in short-necked clam *Tapes (=Ruditapes) philippinarum* in Japan. Fish Pathol. 33: 473~480
- Holmdahl, O. J., Mattsson, J. G., Uggla, A., and Johansson, K. E. 1994. The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. FEMS Microbiol Lett. 119(1-2): 187~192
- Mackin, J. G., Owen, H. M., and Collier, A. 1950. Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). Science, 111: 328~329
- Ray, S. M. 1952. A culture technique for the diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen, and Collier in oysters. Science, 116: 360~361
- Ray, S. M. 1996. Historical perspective on *Perkinsus marinus* disease of oysters in the Gulf of Mexico. Shellfish Res. 15: 9~11
- Rodriguez, F., and Navas, J. 1995. A comparison of gill and hemolymph assays for the thioglycollate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa Perkinsia) in clams *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). Aquaculture, 132: 145~152
- Ulrich, P. N., Ewart, J. W., and Marsh, A. G. 2007. Prevalence of *Perkinsus marinus* (Dermo), *Haplosporidium nelsoni* (MSX), and QPX in Bivalves of Delaware's Inland Bays and Quantitative, High-Throughput Diagnosis of Dermo by QPCR. J. Eukaryot. Microbiol. 54(6): 520~526