



中国寄生虫学与寄生虫病杂志

Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases

ISSN 1000-7423, CN 31-1248/R

《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》网络首发论文

题目： 结合重组酶介导的核酸等温扩增和荧光探针快速检测日本血吸虫基因片段
作者： 赵松，刘燕红，李婷，李伟，张键锋，郭利川，应清界，羊海涛，杨坤
收稿日期： 2018-11-22
网络首发日期： 2019-01-25
引用格式： 赵松，刘燕红，李婷，李伟，张键锋，郭利川，应清界，羊海涛，杨坤. 结合重组酶介导的核酸等温扩增和荧光探针快速检测日本血吸虫基因片段 [J/OL]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1248.r.20190125.0908.002.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

文章编号：1000-7423(2019)-01-0000-05 DOI: 10.12140/j.issn.1000-7423.2019.01.001

【论 著】

结合重组酶介导的核酸等温扩增和荧光探针快速检测日本血吸虫基因片段

赵松¹, 刘燕红², 李婷¹, 李伟¹, 张键锋¹, 郭利川², 应清界², 羊海涛¹, 杨坤^{1*}

【摘要】 目的 结合重组酶介导的核酸等温扩增 (recombinase aided amplification, RAA) 和荧光探针方法建立日本血吸虫特异性基因片段的快速检测方法。方法 以日本血吸虫 G28 (SjG28) 基因片段作为靶序列, 应用 DNAMAN 7.0 软件设计合成引物及荧光探针, 建立荧光 RAA 反应体系。扩增不同拷贝数的 SjG28 重组质粒, 评价荧光 RAA 检测的敏感性; 分别以日本血吸虫、曼氏血吸虫、细粒棘球绦虫、十二指肠钩口线虫、似蚓蛔线虫、华支睾吸虫基因组为模板进行荧光 RAA 检测, 以评价该方法的特异性。采用荧光 RAA 分别检测 500、200 和 50 条日本血吸虫尾蚴感染的兔粪中虫卵 DNA; 分别在 50 只阴性钉螺中混入 1、2、3、4、5、10 只阳性钉螺, 并提取 DNA 进行荧光 RAA 检测。结果 以不同拷贝数的 SjG28 重组质粒为模板进行荧光 RAA 扩增, 在 5 min 时可观察到明显的荧光信号, 随着拷贝数的不断降低, 检测到荧光信号的时间也随之延长, 不同拷贝数的扩增均在 10 min 内完成, 最低可检出的质粒浓度为 10 拷贝/ μ l。以曼氏血吸虫、细粒棘球绦虫、十二指肠钩口线虫、似蚓蛔线虫及华支睾吸虫基因组 DNA 为模板的荧光 RAA 扩增结果均为阴性。不同剂量尾蚴感染的兔粪中提取的 DNA 样品经荧光 RAA 检测, 均能得到有效的扩增, 检测可在 15 min 内完成。含不同数量阳性钉螺的 50 只阴性钉螺提取的日本血吸虫 DNA 经荧光 RAA 检测, 均能得到有效的扩增, 检测可在 10 min 内完成。结论 本研究建立的可检测日本血吸虫核酸片段的荧光 RAA 方法, 反应快捷, 敏感性和特异性均较高。

【关键词】 日本血吸虫; 基因检测; 核酸等温扩增; 重组酶

中图分类号: R383.24 文献标识码: A

Rapid detection of *Schistosoma japonicum* specific gene fragment by real-time recombinase aided isothermal amplification (RT-RAA)

ZHAO Song¹, LIU Yan-hong², LI Ting¹, LI Wei¹, ZHANG Jian-feng¹,
GUO Li-chuan², YING Qing-jie², YANG Hai-tao¹, YANG Kun^{1*}

(1 Key Laboratory of National Health and Family Planning Commission on Parasitic Disease Control and Prevention, Jiangsu Provincial Key Laboratory on Parasite and Vector Control Technology, Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Jiangsu Province, Wuxi 214064, China; 2 Jiangsu Qitian Gene Technology Co. Ltd, Wuxi 214064, China)

【Abstract】 **Objective** To establish a novel and rapid method for detecting *Schistosoma japonicum* specific gene fragment using a real-time recombinase aided isothermal amplification (RAA) with fluorescent probe. **Methods** *S. japonicum* G28 (SjG28) was selected as the target gene to be detected, and the primers and fluorescent probes were designed accordingly. A real-time fluorescent RAA using RAA integrated with fluorescent probe was established to detect SjG28. The sensitivity and specificity of real-time fluorescent RAA was determined and optimized by using gradient diluent SjG28 recombinant plasmid as template and the genomic DNAs from other helminths of *S. mansoni*, *Echinococcus granulosus*, *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides* and *Clonorchis sinensis* as controls. Then this method was applied to detect SjG28 from genomic DNA extracted from snails and feces of rabbits infected with *S. japonicum*. **Results** As low as 10 copies of SjG28 plasmid DNA could be detected by the developed real-time

基金项目: 江苏省医学重点人才 (No. ZDRCA2016056); 江苏省卫生计生委科研课题 (No. X201802)

作者单位: 1 国家卫生和计划生育委员会寄生虫病预防与控制技术重点实验室、江苏省寄生虫与媒介控制重点实验室、江苏省血吸虫病防治研究所, 无锡 214064; 2 江苏省奇天基因生物科技有限公司, 无锡 214064

作者简介: 赵松 (1978-), 男, 硕士研究生, 助理研究员, 从事寄生虫分子生物学研究。

* 通讯作者, E-mail: jipdyk@163.com

网络出版时间:
网络出版路径:

fluorescent RAA within 10 min. This method was able to detect SjG28 in the fecal samples from rabbit infected with different dose of cercarias (20, 200 and 500) within 15 min and snail pool (50) mixed with 1, 2, 3, 4, 5 and 10 cercaria-positive snails within 10 min, however there was no product amplified from genomic DNAs extracted from other helminths: *S. mansoni*, *E. granulosus*, *A. duodenale*, *A. lumbricoides* and *C. sinensis*. **Conclusion** A novel and rapid RT-RAA method was established to detect *S. japonicum* with high sensitivity and specificity.

【 Key words 】 *Schistosoma japonicum*; Gene detection; Isothermal amplification of nucleic acid; Recombinase

Supported by the Project of Invigorating Health Care through Science, Technology and Education, Jiangsu Provincial Medical Talent (No. ZDRCA2016056) and the Fundamental Research Funds of Jiangsu Commission of Health (No. X201802)

* Corresponding author, E-mail: jipdyk@163.com

诊断与检测技术在血吸虫病防治工作中具有重要意义, 化疗对象的确定及化疗效果评价, 防治活动的计划、实施和防治效果评价等各环节都需要诊断检测提供必要的信息和依据^[1]。目前已有多种病原学及免疫学方法应用于血吸虫病的检测, 但在早期诊断及检测敏感性和特异性方面不甚理想^[2-4]。经过多年积极防控, 我国血吸虫病疫情已处于历史较低水平, 人群感染率和感染度大幅度降低, 新形势下的血防工作对诊断方法的敏感性、特异性、稳定性以及操作的便捷性提出更高的要求^[5-6]。同时, 血吸虫病是一种人兽共患寄生虫病, 可寄生于多种宿主, 具有自然疫源性疾病的特征, 是被 WHO 列为极易复现和再现的被忽视热带病之一, 低流行态势下的血吸虫病防治工作需要敏感而高效的监测预警体系^[7]。

湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 是日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 的惟一中间宿主, 感染性钉螺是血吸虫病传播的风险因素。日本血吸虫核酸检测以来源于病原体的特异性基因片段作为检测靶标, 有望为传染源及传播风险因素的检测等血吸虫病监测预警工作提供一种有效的技术手段。本实验室前期已建立一种可特异性扩增日本血吸虫基因片段的重组酶介导的核酸等温扩增方法 (recombinase aided amplification, RAA)^[8], 本研究拟在此基础上探索使用荧光探针进一步提高 RAA 检测的敏感性和特异性, 并改进检测结果的观察, 用荧光信号取代紫外灯下琼脂糖凝胶电泳的观察方法, 建立更加快速简便的日本血吸虫核酸扩增检测方法。

1 材料与方 法

1.1 重组质粒、日本血吸虫、实验动物、钉螺、基因组来源

含日本血吸虫 G28 (SjG28) 基因片段的重组

质粒由本室构建保存。雄性日本大耳兔 20 只, 体质量 2~3 kg, 购于扬州大学实验动物中心, 动物许可证号: SYXK (苏) 2017-0049。日本大耳兔经腹部贴片感染 1 500 条日本血吸虫尾蚴 (中国大陆株, 本所钉螺室提供), 感染后 42 d 安乐死后剖杀, 门静脉灌注法收集成虫, 分离肝脏, 组织匀浆器研磨, 经筛网过滤除去肝脏组织后收集虫卵。曼氏血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*)、华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*)、似蚓蛔线虫 (*Ascaris Lumbricoides*)、十二指肠钩口线虫 (*Ancylostoma duodenale*) 基因组 DNA, 以及阴性钉螺和日本血吸虫阳性钉螺均由国家卫生和计划生育委员会寄生虫病预防与控制技术重点实验室提供。

1.2 主要试剂和仪器

血液/组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 粪样基因组 DNA 提取试剂盒购自美国 Qiagen 公司, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ l)、dNTP 购自美国 Promega 公司, 引物及探针由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 50 \times TAE 缓冲液、琼脂糖购自北京索莱宝科技有限公司, DNA 分子质量标志物购自美国 MBI 公司, 重组酶、单链结合蛋白、UvsY 蛋白、核酸外切酶购自江苏奇天基因生物科技有限公司。荧光检测仪 (F1620) 为江苏奇天基因生物科技有限公司产品。

1.3 设计引物及探针

根据本课题组前期对多个日本血吸虫来源的序列片段的筛选, 以 SjG28 基因片段作为靶序列。应用 DNAMAN 7.0 软件进行序列比对, 根据其保守区序列设计 1 对引物和 1 条探针, 上游引物为 Sch-F: 5' -CATTGTGTGAGCAGCCAGGAAGTGACAATC-3', 下游引物为 Sch-R: 5' -CTATATTAGAGGCGT-GAGGTTATACAGTTA-3', 探针为 Sch-P: 5' -CATA-GGAGGTCATCTTGTTC AAGGTCAAG/i6FAMdT//idSp//

iBHQdT/CACCATCAACTCTTA-3'，用 Amplifx 分析软件分析其可行性，引物和探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 荧光 RAA 反应体系的建立

荧光 RAA 反应体系为 50 μ l；Tris 缓冲液 30 mmol/L、醋酸钾 100 mmol/L、醋酸镁 20 mmol/L、二硫苏糖醇 6 mmol/L、质量浓度为 6% 的聚乙二醇(PEG-35000)、ATP 5 mmol/L、dNTPs 0.4 mmol/L、磷酸肌酸 80 μ g/U、单链结合蛋白 500 ng/ μ l、重组酶 200 ng/ μ l、UvsY 蛋白 200 ng/ μ l、核酸外切酶 200 ng/ μ l、荧光探针 150 nmol/L、DNA 聚合酶 150 ng/ μ l、正向引物 400 nmol/L 和反向引物 400 nmol/L、日本血吸虫成虫基因组待测 DNA 50 ng。阴性对照以双蒸水代替 DNA。将以上反应体系震荡混匀，置荧光检测仪中，39 $^{\circ}$ C 反应 30 min，每 20 s 采集 1 次荧光值。

1.5 荧光 RAA 敏感性和特异性评价

将 SjG28 重组质粒进行梯度稀释，依次为 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、10 拷贝/ μ l，以稀释后的重组质粒为模板进行扩增，观察荧光 RAA 的敏感性。

分别以日本血吸虫、曼氏血吸虫、细粒棘球绦虫、十二指肠钩口线虫、似蚓蛔线虫、华支睾吸虫基因组为模板进行荧光 RAA 检测，以评价该法的特异性。

1.6 荧光 RAA 检测日本血吸虫感染兔粪中的虫卵 DNA

20 只大耳兔分为 4 组，每组 5 只，感染组分别以 500、200 和 50 条日本血吸虫尾蚴腹部贴片法感染，阴性对照组不做任何处理。感染后 42 d 以塑料杯顶管孵化法检查兔粪，查见血吸虫毛蚴后收集粪样，用粪样基因组 DNA 提取试剂盒提取粪样 DNA，以此为模板进行荧光 RAA 扩增。

1.7 荧光 RAA 检测日本血吸虫感染钉螺的基因组 DNA

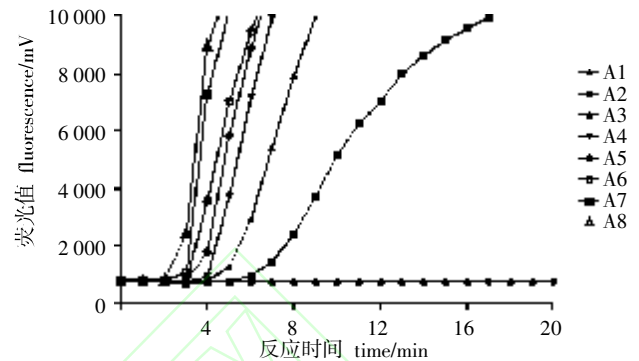
分别在 50 只阴性钉螺中混入 1、2、3、4、5、10 只阳性钉螺，将钉螺压碎，解剖镜下挑取软体组织，参照血液/组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒操作手册提取 DNA。以单只阴性钉螺提取的 DNA 为阴性对照，进行荧光 RAA 检测。

2 结果

2.1 荧光 RAA 的敏感性

以不同拷贝数的 SjG28 重组质粒为模板进行荧光 RAA 扩增，在 5 min 时即可观察到明显的荧光

信号，随着拷贝数的不断降低，检测到荧光信号的时间也随之延长，不同拷贝数的扩增均在 10 min 内完成，最低可以扩增出 10 拷贝的 SjG28 重组质粒(图 1)。



A1: 阴性对照; A2~A8: 分别为 10^1 ~ 10^7 拷贝

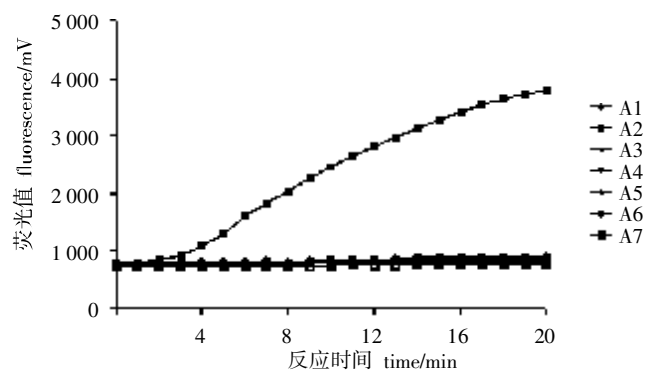
A1: Negative control; A2-A8: 10^1 - 10^7 copies of SjG28 plasmid

图 1 荧光 RAA 扩增不同拷贝数 SjG28 重组质粒的结果

Fig. 1 Detection of different copies of SjG28 plasmid by RT-RAA

2.2 荧光 RAA 的特异性

分别以日本血吸虫、曼氏血吸虫、细粒棘球绦虫、十二指肠钩虫、蛔虫、华支睾吸虫基因组 DNA 进行荧光 RAA 检测，日本血吸虫基因组 DNA 所在的检测通道出现相应的特异性荧光扩增曲线，其他寄生虫基因组 DNA 所在的通道未见荧光扩增，无交叉反应(图 2)。



A1: 日本血吸虫成虫; A2: 阴性对照; A3: 曼氏血吸虫; A4: 华支睾吸虫; A5: 蛔虫; A6: 细粒棘球绦虫; A7: 十二指肠钩虫

A1: *S. japonicum*; A2: Negative control; A3: *S. mansoni*; A4: *C. sinensis*; A5: *A. lumbricoides*; A6: *E. granulosus*; A7: *A. duodenale*

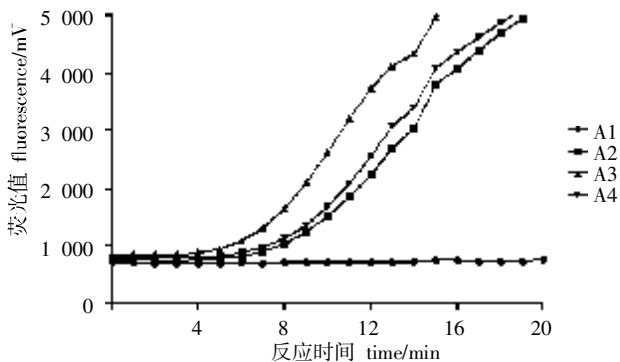
图 2 荧光 RAA 检测不同虫种基因组 DNA 的特异性

Fig. 2 Specificity of RT-RAA to detect SjG28 from *S. japonicum* genomic DNA

2.3 日本血吸虫感染兔粪中的虫卵 DNA 荧光 RAA 检测结果

荧光 RAA 分别检测 500、200 和 50 条尾蚴感

染的兔粪 DNA, 均能得到有效的扩增, 可检测到荧光, 检测可在 15 min 内完成。阴性对照组未检测到荧光信号 (图 3)。

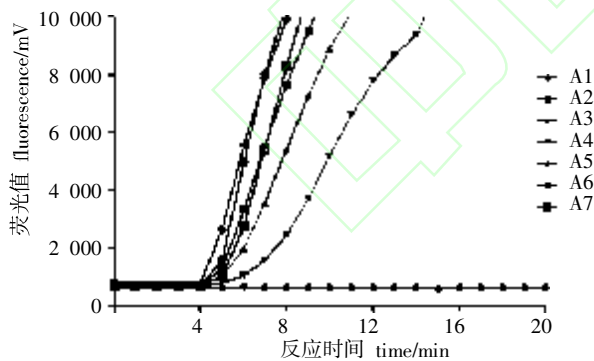


A1: 50 条尾蚴感染组; A2: 200 条尾蚴感染组; A3: 500 条尾蚴感染组; A4: 阴性对照
A1: 50 cercariae; A2: 200 cercariae; A3: 500 cercariae; A4: Negative control

图 3 荧光 RAA 检测日本血吸虫感染兔粪中的虫卵 DNA 结果
Fig. 3 Sensitivity of RT-RAA to detect *S. japonicum* eggs in fecal samples from rabbits infected with different dose of cercariae

2.4 日本血吸虫感染钉螺的荧光 RAA 检测结果

含不同数量阳性钉螺的 50 只阴性钉螺提取的日本血吸虫 DNA 经荧光 RAA 检测, 均能得到有效的扩增, 可检测到荧光, 检测结果可在 10 min 内完成。而阴性钉螺提取的 DNA 样本经荧光 RAA 检测, 未检测到荧光信号 (图 4)。



A1~A5: 50 只钉螺中分别混有 1、2、3、4、5、10 只阳性钉螺;
A6: 阴性对照
A1~A5: 50 snails mixed with 1, 2, 3, 4, 5, 10 infected snails;
A1: Negative control

图 4 荧光 RAA 检测日本血吸虫感染钉螺结果

Fig. 4 RT-RAA detects *SjG28* in the genomic DNAs extracted from snails mixed with different number of cercaria-positive snails

3 讨论

当前我国血吸虫病呈低流行态势, 流行区人群血吸虫感染率和患者感染度均较低, 亟需建立灵敏

性和特异性均较高的诊断技术, 以满足现场防治工作的需要。传统的病原学检测方法, 如加藤厚涂片法及尼龙绢集卵孵化法是目前用于血吸虫病诊断的“金标准”, 但操作过程费时、费力, 群众依从性低, 且低度流行区漏检率较高^[9-10]。目前常用的血清学检测技术, 如间接红细胞凝集试验以及胶体染料试纸条法具有较高的灵敏度, 在流行区化疗对象的大规模筛查和血清流行病学调查等方面发挥了重要作用, 但这些免疫诊断技术不能区别现症感染和既往感染, 疗效考核价值不理想, 且可能由于抗原与非特异性抗体的结合出现交叉反应。

近年来, 已有多种核酸检测方法应用于血吸虫感染的检测, 包括常规 PCR 技术、荧光定量 PCR 技术、巢式 PCR 技术和环介导等温扩增反应 (LAMP) 等^[11-15]。但常规 PCR、荧光定量 PCR 和巢式 PCR 技术均需专门用于热循环反应的温度控制设备, 且检测时间较长, 对检验人员技术要求高, 难以在血吸虫病防治现场推广应用。

本课题组在前期研究中曾建立了日本血吸虫特异性基因片段的 RAA 检测方法, 与经典的 PCR 相比, 检测可在 37 °C 进行, 不依赖于复杂的温度控制设备, 且敏感性相当, 以重组质粒为模板, 在 50 μ l 的反应体系中检测敏感性为 1 000 个拷贝^[8]。在此基础上, 本研究进一步采用荧光探针提高了 RAA 检测方法的敏感性。其可行性在于 RAA 方法的扩增产物为均一的特定长度的基因片段, 这是 RAA 与另一经典的核酸等温扩增 LAMP 法不同之处。LAMP 是目前研究最为广泛的一种恒温核酸体外扩增技术, 其反应灵敏度高于巢式 PCR, 若使用荧光染料, 还可以直接肉眼观察反应结果。然而, LAMP 反应获得的扩增产物是一些大小不等的片段, 无法直接克隆和测序, 只能用于定性判断目的基因的存在, 且这些产物易形成气溶胶, 造成检测环境的污染^[16]。RAA 法是采用来自于大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 的重组酶与引物形成酶和引物的聚合物, 在模板 DNA 上搜索到与引物互补的序列区域时, 在单链 DNA 结合蛋白的帮助下使模板 DNA 解链, 并在 DNA 聚合酶的作用下形成新的 DNA 互补链, 因此反应产物为与常规 PCR 相同的均一的特定长度的基因片段。荧光 RAA 在重组酶介导的核酸等温扩增的基础上加入荧光探针, 在保证特异性的基础上, 敏感性进一步提高, 50 μ l 的反应体系中最低可检出 10 拷贝的重组质粒, 与前期建立的 RAA 方法相比提高了 2 个数量级。借助于小型荧光反应仪, 荧光 RAA 扩增的荧光信号可

以实时观测, 取代了约需 1 h 的凝胶电泳观测方法, 整个检测反应过程进一步缩短, 可在 10~15 min 内完成, 使检测反应更加快捷。

本研究成功检测到日本血吸虫感染兔粪中的 DNA, 显示了该方法在血吸虫病诊断中的应用前景。日本血吸虫成虫主要寄生于门静脉系统和肠系膜静脉, 虫卵脱落进入肠腔, 随粪便排出体外, 因而粪便是主要的检测样品。传统的病原学检测方法即以粪便作为检测样品, 但以粪样中的虫卵作为检测对象, 不适于血吸虫病的早期诊断, 至虫卵脱落随粪便排出, 已有大量虫卵沉积在肝脏, 对宿主造成进行性损害^[17]。血吸虫自尾蚴侵入皮肤至发育成熟过程中, 不断更新脱落的表膜或死亡虫体、虫卵崩解所含的血吸虫 DNA 有可能进入体循环, 血液中可能存在微量血吸虫核酸片段, 并且目前现场防治工作中群众对粪检的依从性较低, 荧光 RAA 在以血吸虫病患者血清作为检测样本中的应用值得进一步研究。本研究中日本血吸虫感染性钉螺及非感染性钉螺经荧光 RAA 检测, 均得到与传统的逸蚴法一致的结果, 有望建立一种新的钉螺检测方法。传统的钉螺解剖采用镜检法, 仅能从形态上鉴别出处于尾蚴或子胞蚴发育阶段的感染性钉螺。日本血吸虫在钉螺体内经过毛蚴, 母胞蚴, 子胞蚴及尾蚴各发育阶段, 历时至少 42 d, 甚至长达 160 d^[18]。因此, 本课题组拟进一步开展荧光 RAA 法在感染性钉螺早期检测方面的应用研究。

志谢 感谢江苏省血吸虫病防治研究所戴洋副研究员提供细粒棘球绦虫、十二指肠钩口线虫、似蚓蛔线虫及华支睾吸虫基因组 DNA。

出版授权 作者同意以纸质版和网络版的形式同时出版。

数据和材料的可及性 有关病例数据和材料恕不能提供。

利益冲突 作者声明无利益冲突。

作者贡献 赵松负责实验设计、数据汇总分析与论文撰写, 杨坤指导数据分析与论文撰写, 刘燕红、李婷负责基因检测及动物实验, 李伟、张键锋、郭利川负责检测样品的收集, 应清界、羊海涛参与实验设计及论文撰写。

参 考 文 献

- [1] 吴观陵. 我国血吸虫病免疫诊断发展的回顾与展望 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, (s1): 323-328.
- [2] Zhou XN, Xu J, Chen HG, et al. Tools to support policy decisions related to treatment strategies and surveillance of schistosomiasis japonica towards elimination [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2011, 5(12): e1408.
- [3] Xu J, Peeling RW, Chen JX, et al. Evaluation of immunoassays for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection using archived sera [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2011, 5(1): e949.
- [4] 刘茜, 余传信. 血吸虫现症感染诊断方法的研究进展 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2016, 28(2): 220-224.
- [5] 许静, 杨坤, 李石柱, 等. 我国血吸虫病传播控制后的监测体系 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2014, 26(1): 1-5.
- [6] 周晓农. 开展精准防治实现消除血吸虫病的目标 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2016, 28(1): 1-4.
- [7] Spear RC, Seto EY, Carlton EJ, et al. The challenge of effective surveillance in moving from low transmission to elimination of schistosomiasis in China [J]. Int J Parasitol, 2011, 41(12): 1243-1247.
- [8] 赵松, 李婷, 杨坤, 等. 重组酶介导的日本血吸虫特异性基因片段核酸等温扩增检测方法的建立 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2018, 30(3): 273-277, 306.
- [9] Zhu YC. Immunodiagnosis and its role in schistosomiasis control in China: a review [J]. Acta Trop, 2005, 96(2/3): 130-136.
- [10] You H, Mcmanus DP. Vaccines and diagnostics for zoonotic schistosomiasis japonica [J]. Parasitology, 2015, 142(2): 271-289.
- [11] Xia CM, Rong R, Lu ZX, et al. *Schistosoma japonicum*: a PCR assay for the early detection and evaluation of treatment in a rabbit model [J]. Exp Parasitol, 2009, 121(2): 175-179.
- [12] Utzinger J, Becker SL, Van Lieshout L, et al. New diagnostic tools in schistosomiasis [J]. Clin Microbiol Infect, 2015, 21(6): 529-542.
- [13] Xu J, Guan ZX, Zhao B, et al. DNA detection of *Schistosoma japonicum*: diagnostic validity of a LAMP assay for low-intensity infection and effects of chemotherapy in humans [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(4): e0003668.
- [14] Notomi T, Mori Y, Tomita N, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects [J]. J Microbiol, 2015, 53(1): 1-5.
- [15] He P, Song LG, Xie H, et al. Nucleic acid detection in the diagnosis and prevention of schistosomiasis [J]. Infect Dis Poverty, 2016, 5: 25.
- [16] Li J, Macdonald J. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes [J]. Biosens Bioelectronics, 2015, 64(64C): 196-211.
- [17] Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, et al. Human schistosomiasis [J]. Lancet, 2014, 383(9936): 2253-2264.
- [18] 吴观陵. 人体寄生虫学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 287.

(收稿日期: 2018-11-22 编辑: 衣凤芸)