

基于重组酶介导等温扩增技术的细粒棘球绦虫核酸检测方法的建立

丁昕¹, 刘燕红², 倪碧娴¹, 王晓婷¹, 徐祥珍¹, 应清界², 戴洋^{1*}, 曹俊¹

【摘要】 目的 建立一种基于重组酶介导等温扩增技术(RAA)的细粒棘球绦虫核酸检测方法。**方法** 针对细粒棘球绦虫 *12S rRNA* 基因序列片段,设计、筛选并合成 RAA 特异性扩增引物和荧光检测探针,构建细粒棘球绦虫荧光 RAA 检测方法。分别以含靶序列的不同拷贝数重组质粒和不同浓度细粒棘球绦虫基因组 DNA 为模板进行荧光 RAA 扩增,评价其检测灵敏度;分别以细粒棘球绦虫、多房棘球绦虫、日本血吸虫、曼氏血吸虫、十二指肠钩虫、华支睾吸虫、牛带绦虫、曼氏迭宫绦虫、猪带绦虫基因组 DNA 为模板进行荧光 RAA 扩增,评价其检测特异性。**结果** 成功建立了细粒棘球绦虫荧光 RAA 检测法,在 39 ℃ 条件下 20 min 内可以实现对细粒棘球绦虫基因组 DNA 特异性扩增,最低可以检测出 10 拷贝/μL 含靶序列的重组质粒 DNA 和 0.1 ng/μL 细粒棘球绦虫基因组 DNA 样本,具备较高敏感性;对多房棘球绦虫、日本血吸虫、曼氏迭宫绦虫、猪带绦虫基因组 DNA 均无阳性扩增,具备较高特异性;且该荧光 RAA 法可成功检出细粒棘球绦虫包囊中 DNA。**结论** 成功建立了一种快速、灵敏、特异的可用于细粒棘球绦虫核酸检测的荧光 RAA 法。

【关键词】 细粒棘球绦虫;重组酶;核酸等温扩增;荧光探针;诊断效能

【中图分类号】 R383.33 **【文献标识码】 A**

Establishment of a nucleic acid assay for detection of *Echinococcus granulosus* based on recombinase-aided isothermal amplification technique (RAA)

DING Xin¹, LIU Yan-Hong², NI Bi-Xian¹, WANG Xiao-Ting¹, XU Xiang-Zhen¹, YING Qing-Jie², Dai Yang^{1*}, CAO Jun¹

1 National Health Commission Key Laboratory of Parasitic Disease Control and Prevention, Jiangsu Provincial Key Laboratory on Parasite and Vector Control Technology, Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Public Health Research Center, Jiangnan University, Wuxi 214064, China; 2 Jiangsu Qitian Gene Technology Co., Ltd., China

* Corresponding author

【Abstract】 Objective To establish a nucleic acid assay for detection of *Echinococcus granulosus* based on recombinase-aided isothermal amplification technique (RAA). **Methods** The *12S rRNA* gene of *E. granulosus* was selected as the target gene, and the specific primers and fluorescent probes for RAA assay were designed, screened and synthesized to establish a fluorescent RAA assay for detection of *E. granulosus*. The sensitivity of the fluorescent RAA assay was evaluated using different copy numbers of target gene sequence-contained recombinant plasmids and various concentrations of *E. granulosus* genomic DNA as templates, and the specificity of the fluorescent RAA assay was evaluated using the genomic DNA from *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Ancylostoma duodenale*, *Clonorchis sinensis*, *Taenia saginata*, *Spirometra mansoni* and *Taenia solium* as templates. **Results** A fluorescent RAA assay was successfully established for detection of *E. granulosus*, which achieved specific amplification of *E. granulosus* genomic DNA within 20 min at 39 ℃. The lowest detection limit of the fluorescent RAA assay was 10 copies/μL of recombinant plasmids and 0.1 ng/μL *E. granulosus* genomic DNA, which exhibited a high sensitivity, and the fluorescent RAA assay was all negative for the genomic DNA from *E. multilocularis*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, *A. duodenale*, *C. sinensis*, *T. saginata*, *Spirometra mansoni* and *T. solium*, which exhibited a high specificity. In addition, this fluorescent RAA assay successfully detected genomic DNA from *E. granulosus* cysts. **Conclusion** A rapid, sensi-

【基金项目】 江苏省“科教强卫工程”项目(ZDXKA2016016);省属公益类科研院所自主科研项目(BM2018020);江苏省青年医学人才项目(QN-RC2016622)

【作者单位】 1 国家卫生健康委员会寄生虫病预防和控制技术重点实验室、江苏省寄生虫与媒介控制技术重点实验室、江苏省血吸虫病防治研究所、江南大学公共卫生研究中心(无锡214064); 2 江苏省奇天生物科技有限公司

【作者简介】 丁昕,男,硕士,医师。研究方向:寄生虫病防治

* 通信作者 E-mail:15951581011@163.com;ORCID:0000-0003-1489-9080

【数字出版日期】 2020-07-02 16:18

【数字出版网址】 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1374.R.20200702.1001.001.html>

tive and specific fluorescent RAA assay is successfully established for nucleic acid detection of *E. granulosus*.

[Key words] *Echinococcus granulosus*; Recombinase; Isothermal amplification; Fluorescent probe; Nucleic acid detection; Diagnostic performance

细粒棘球蚴病是由细粒棘球绦虫幼虫(棘球蚴)引起的一种危害严重的人兽共患寄生虫病^[1]。该病呈世界性分布,主要流行于中东、南欧、拉丁美洲、中亚、大洋洲、非洲等地区,尤以放牧、半农半牧为主要畜牧业生产方式的地区最为严重^[2]。在我国,有23个省(直辖市、自治区)报告细粒棘球蚴病病例,尤以西部地区四川、新疆、甘肃、青海、宁夏、西藏和内蒙古等省(自治区)流行较为严重^[3-4]。

细粒棘球绦虫终末宿主(犬)和中间宿主(牛、羊)监测是棘球蚴病防控的重要环节^[5]。目前,我国细粒棘球绦虫终末宿主监测主要采用夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)检测犬棘球绦虫粪抗原,该方法检测时间3~4 h、需特定仪器设备,且由于流浪犬体内可能存在多种绦虫寄生,ELISA法检测易出现假阳性^[6];犬导泻法虽可在一定程度上提升检测特异性,但该方法操作繁琐、对操作人员技能要求高,且存在现场监测工作量大等不足,限制了其大规模现场应用^[7]。中间宿主监测主要是通过查看、触摸牛、羊等肝、肺脏器表面和实质内有无囊状物或硬结,对发现的囊状物或硬结进行剖检和鉴别,对疑似样本进行进一步PCR复核;该监测方法较多依赖于专业人员经验和技能,且PCR技术对人员、设备及实验环境要求高,检测时间长(1.5~2 h)^[8]。因此,开发高效、便捷的针对细粒球绦虫核酸的快速检测方法是当前棘球蚴病监测工作中亟待解决的问题。

重组酶介导等温核酸扩增技术(Recombinase-aided isothermal amplification, RAA)可以利用重组酶、单链结合蛋白、DNA聚合酶在等温条件(25~42℃)下、5~20 min内实现对核酸的高效扩增,该方法具有操作便捷、反应时间短等优势^[9]。目前,RAA技术已成功用于日本血吸虫、隐孢子虫和华支睾吸虫等寄生虫核酸检测,均显示出较高敏感性和特异性,具备现场应用推广的潜在价值^[10-12]。本研究拟在针对细粒棘球绦虫特异性核酸序列筛选、比对的基础上,建立基于RAA技术的细粒棘球绦虫核酸检测方法,并对其检测灵敏度及特异性进行初步评价。

材料和方法

1 材料

1.1 虫体样本 细粒棘球绦虫包囊、日本血吸虫虫

卵、曼氏血吸虫虫卵、十二指肠钩蚴培养物、华支睾吸虫囊蚴、牛带绦虫、曼氏迭宫绦虫、猪带绦虫孕节等样本均由江苏省寄生虫病防治研究所收集、保存;多房棘球绦虫幼虫样本由新疆医科大学李军教授惠赠。

1.2 主要仪器设备 NanoDrop 2000核酸蛋白浓度测定仪购自Thermo Scientific公司;离心机为Eppendorf公司产品;-80℃超低温冰箱购自海尔公司;QT-RAA-B6100恒温震动混匀仪和RAA-F1620荧光基因检测仪由江苏奇天基因生物科技有限公司提供。

1.3 主要试剂 组织DNA提取试剂盒购自江苏奇天基因生物科技有限公司;QIAamp PowerFecal DNA提取试剂盒为Qiagen公司产品;RAA基础反应单元和RAA荧光基础反应单元由江苏奇天基因生物科技有限公司提供;质粒抽提试剂盒为Promega公司产品;TAE缓冲液、琼脂糖、溴化乙锭(EB)购自北京索莱宝科技有限公司。

2 方法

2.1 DNA提取 采用DNeasy Blood & Tissue组织核酸提取试剂盒提取细粒棘球绦虫包囊、多房棘球绦虫幼虫、十二指肠钩蚴培养物、华支睾吸虫囊蚴、牛带绦虫孕节、曼氏迭宫绦虫孕节和猪带绦虫孕节基因组DNA,采用QIAamp PowerFecal DNA提取试剂盒提取日本血吸虫、曼氏血吸虫虫卵基因组DNA,操作均按照试剂盒说明书进行。所有抽提的DNA样本经核酸蛋白浓度测定仪测定浓度后,置-80℃贮存备用。

2.2 特异性核酸序列筛选及引物设计 通过GenBank数据库查找到细粒棘球绦虫12S rRNA全基因序列,并运用DNAMAN 7.0软件进行多序列比对及同源性分析,选择其中一段保守序列作为RAA检测靶基因。根据RAA原理,应用Amplifx软件设计特异性扩增靶序列上(5'-TCTTGTAAGTAAATTTATGTGGT-GATAAGTGAG-3')、下游引物(5'-CTCTAACCTTAT-CAAAAACACACATCACCAA-3')及探针序列(5'-AACTGTTTGGTTGTTTAGAATTTAGTGGGA (FAM) G (THF) T (BHQ) AGGTGGCTATTAGGT-3',其中FAM为荧光报告基团,THF为四氢呋喃残基,BHQ为荧光淬灭基团),引物、探针和质粒均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

2.3 RAA法的建立

2.3.1 基础RAA法 构建50 μL基础RAA反应体

系,含基础RAA反应单元47 μL (500 mmol/L Tris 缓冲液、250 mmol/L 醋酸镁、10% 聚乙二醇、二硫苏糖醇、磷酸肌酸、ATP、dNTPs、单链结合蛋白、重组酶、UvsY 蛋白、DNA 聚合酶)、上游和下游引物各 1 μL (浓度均为 0.05 mmol/L)、1 μL 细粒棘球绦虫基因组 DNA 样本。将以上反应体系混匀,置于恒温震荡混匀仪中,39 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 20 min。反应结束后,将反应管取出,扩增产物中加入 1:1 酚/氯仿 50 μL ,振荡混匀,12 000 $\times g$ 离心 1 min。吸取 10 μL 上层溶液进行琼脂糖凝胶电泳(凝胶浓度为 1%, 100 V) 60 min, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ EB 染色后,置于紫外灯下观察结果。

2.3.2 荧光 RAA 法 50 μL 荧光 RAA 法反应体系包括 46 μL 反应缓冲液, 2 μL 上、下游引物(浓度均为 0.05 mmol/L), 1 μL 探针复合物(浓度为 0.02 mmol/L), 1 μL 待测样品、阴性质控品(ddH₂O)、阳性质控品或临界阳性质控品(阳性质控品和临界阳性质控品分别为含有 10¹⁰ 拷贝/ μL 和 10³ 拷贝/ μL 细粒棘球绦虫 DNA 片段的质粒)。将以上反应体系置于恒温震荡混匀仪中震荡混匀,结束后置于 QT-RAA-F1620 荧光检测仪中 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min, 每 20 s 采集 1 次荧光值。在 20 min 内 FAM 荧光检测仪器检测信号可明显增强,根据 QT-RAA-F1620 荧光检测仪阳性判定方法,斜率值 $K \geq 20$ 时为阳性,斜率值 $K < 20$ 时则为阴性。

2.4 荧光 RAA 法检测敏感性评价

2.4.1 以不同拷贝数含靶序列的重组质粒为模板

将含细粒棘球绦虫靶序列 DNA 片段的重组质粒转接至大肠埃希菌 DH5 α 培养,抽提获得重组质粒,分别制成 10、10²、10³、10⁴ 拷贝/ μL 检测样品,以此为模板分别进行 RAA 扩增,检测荧光信号。

2.4.2 以不同浓度细粒棘球绦虫 DNA 为模板 将初始浓度为 30 ng/ μL 细粒棘球绦虫基因组 DNA 稀释至 10 ng/ μL , 然后进行梯度稀释,得到浓度为 10、1、0.1、0.01 ng/ μL 的 DNA 样本,然后各取 5 μL 作为模板进行 RAA 扩增并检测荧光信号。

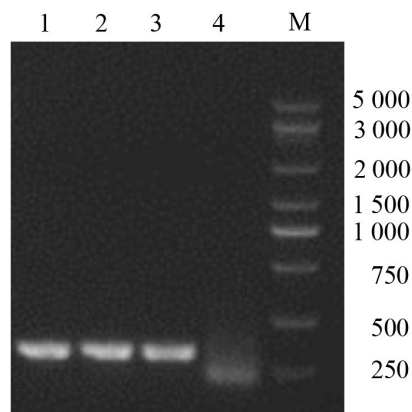
2.5 荧光 RAA 法检测特异性评价 分别以细粒棘球绦虫包囊、多房棘球绦虫幼虫、日本血吸虫虫卵、曼氏血吸虫虫卵、十二指肠钩端培养物、华支睾吸虫囊蚴、牛带绦虫孕节、曼氏迭宫绦虫孕节、猪带绦虫孕节基因组 DNA 为模板,进行荧光 RAA 扩增,检测荧光信号。

结 果

1 细粒棘球绦虫 DNA 基础 RAA 检测结果

以细粒棘球绦虫基因组 DNA 为模板进行基础

RAA 反应,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳。经 EB 染色后在紫外灯下可观察到目的条带,大小约为 391 bp(图 1)。



注:1~3 细粒棘球绦虫基因组 DNA;4 阴性对照;M DNA 分子量标志物

Note: 1~3 *E. granulosus* genomic DNA; 4 Negative control; M DNA molecular marker

图 1 细粒棘球绦虫基因组 DNA 经 RAA 扩增后琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose electrophoresis of products of RAA amplification of *E. granulosus* genomic DNA

2 细粒棘球绦虫基因组 DNA 荧光 RAA 法检测

以细粒棘球绦虫基因组 DNA 样本为模板进行荧光 RAA 法扩增,在反应温度为 39 $^{\circ}\text{C}$ 时,荧光信号在 6 min 开始有明显扩增,两个样本 K 值分别为 214 和 205;而阴性对照样本则未观察到现信号峰出现(图 2)。

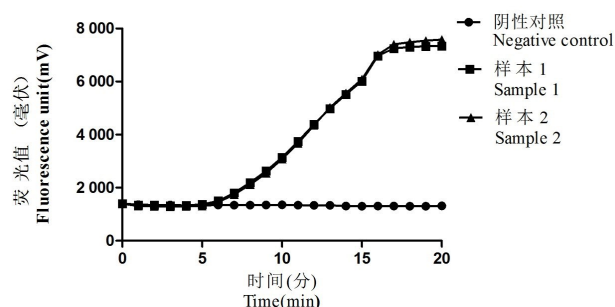


图 2 荧光 RAA 法检测细粒棘球绦虫包囊 DNA 样本

Fig. 2 Fluorescent RAA assay for detection of DNA samples from *E. granulosus* cysts

3 荧光 RAA 法检测敏感性

采用荧光 RAA 法扩增含 10、10²、10³、10⁴ 拷贝/ μL 细粒棘球绦虫 DNA 的重组质粒,检测结果显示最快 3 min 即有明显扩增,10 min 后所有样品均已扩增;随着拷贝数的降低,检测到明显增加的荧光信号所需时

间逐渐延长(K 值依次为6 732、3 837、1 075、116)。本次实验最低可检测到含有10 拷贝/ μL 重组质粒的荧光信号(图3)。

采用荧光RAA法检测不同浓度细粒棘球绦虫基因组DNA样本。结果显示,除阴性对照外,浓度分别为10、1、0.1 ng/ μL 的细粒棘球绦虫基因组DNA样本均出现阳性扩增(K 值分别为7 186、1 675、296),检测敏感性可达0.1 ng/ μL 基因组DNA(图4)。

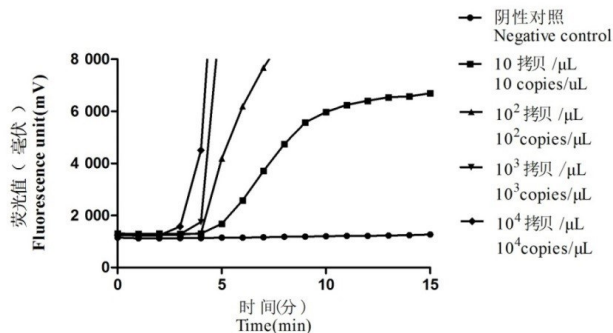


图3 以不同拷贝数重组质粒为模板的荧光RAA法检测敏感性

Fig. 3 Sensitivity of fluorescent RAA assay using various copy numbers of recombinant plasmids as templates

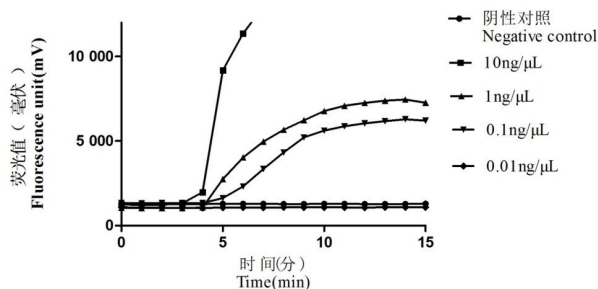


图4 以不同浓度细粒棘球绦虫基因组DNA为模板的荧光RAA法检测敏感性

Fig. 4 Sensitivity of fluorescent RAA assay using different concentrations of *E. granulosus* genomic DNA samples as templates

4 荧光RAA法检测特异性

分别以细粒棘球绦虫包囊、多房棘球绦虫幼虫、日本血吸虫虫卵、曼氏血吸虫虫卵、十二指肠钩端培养物、华支睾吸虫囊蚴、牛带绦虫孕节、曼氏迭宫绦虫孕节、猪带绦虫孕节基因组DNA为模板进行荧光RAA扩增,结果显示,细粒棘球绦虫包囊DNA存在阳性扩增(K 值为657),其他样本扩增结果均为阴性(图5)。

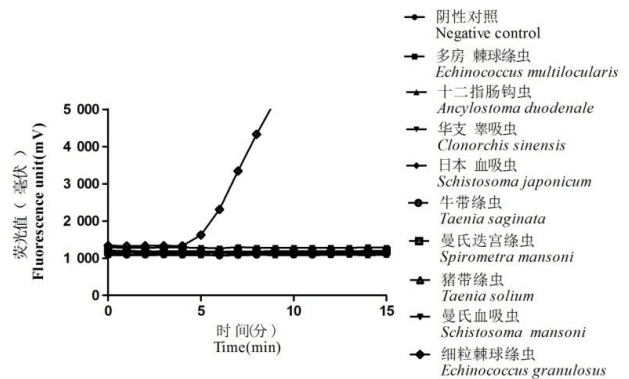


图5 荧光RAA法检测特异性

Fig. 5 Specificity of fluorescent RAA assay

讨论

棘球蚴病在我国中西北部地区仍存在较大范围流行,严重威胁着流行区人民群众身体健康和生活水平^[13];同时,随着西部牛羊等大量流入东部地区,也给当地带来了一定的棘球蚴病传播风险^[14]。

羊、牛等中间宿主和犬等终末宿主感染监测在棘球蚴病防治中发挥了十分重要的作用^[5]。目前,主要采用手动触诊结合分子生物学鉴定、犬粪抗原ELISA结合导泻法进行宿主感染监测^[5]。采用导泻法或疑似阳性感染犬解剖查找检获虫体,是犬类确诊棘球蚴感染的金标准,但该方法较为耗费时力,并且会对犬造成伤害,故不适合流行区大规模犬类感染筛查^[7]。ELISA可用于病犬粪便中抗原检测,然而在犬类感染症状较轻或者发病率较低地区进行现场筛查时会呈现较低检出率^[7]。基于PCR技术的分子生物学检测方法,已用于细粒棘球绦虫核酸检测、鉴定及基因分型^[13-14];但PCR方法所需检测时间较长(一般2 h左右)、需在实验室条件下完成检测,同时容易受所采粪样量和成分复杂性影响,导致实际检测敏感性并不高^[17]。既往曾有利用环介导等温扩增技术(LAMP)对细粒棘球绦虫DNA检测的报道,并显示了较高特异性和敏感性^[18],但其繁琐的引物设计环节不利于其现场监测中的进一步推广应用。因此,研发敏感、高效以及设计操作均便捷的核酸检测技术对于我国开展棘球蚴病监测工作具有深远意义。

近年来,RAA技术凭借引物设计步骤简单、可操作性强、现场检测效能高等优势,已广泛用于多种病原体检测^[9-12]。本研究选择完全国产化的重组酶为基础建立了等温核酸荧光检测技术,可实现对细粒棘球绦虫DNA序列的实时高效扩增,具备较好的敏感性

和特异性,并成功完成了对本实验室所保存的细粒棘球绦虫包囊样本检测,显示了潜在应用价值,后续将进一步采集流行区犬粪样本进行检测效能评估。Moradi等^[19]发现,在手术中获取的细粒棘球绦虫患者血清及囊肿组织中均可以检测出细粒棘球绦虫 *cox1* 和 *nad1* 基因,证实了细粒棘球绦虫 DNA 可以通过包囊壁渗透入血液循环的现象,提示可通过血清核酸检测技术实现细粒棘球绦虫早期诊断。本研究建立的荧光RAA法能否用于血清中细粒棘球绦虫特异性DNA片段的检测尚有待进一步研究。

综上所述,本研究成功建立了一种基于重组酶介导的等温核酸扩增技术,其具备简便、快速、灵敏、特异等优势,可用于细粒棘球绦虫核酸样本实时检测,为细粒棘球绦虫核酸检测提供了一种新的技术手段。

【参考文献】

- [1] Agudelo Higuera NI, Brunetti E, McCloskey C. Cystic echinococcosis[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(3): 518-523.
- [2] Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis[J]. Adv Parasitol, 2017, 95: 315-493.
- [3] Li K, Shahzad M. Epidemiology of cystic echinococcosis in China (2004-2016)[J]. Travel Med Infect Dis, 2020, 33: 101466.
- [4] Huang D, Li R, Qiu J, et al. Geographical environment factors and risk mapping of human cystic echinococcosis in Western China[J]. Int J Environ Res Public Health, 2018, 15(8): 1729.
- [5] Weng X, Mu Z, Wei X, et al. The effects of dog management on *Echinococcus* spp. prevalence in villages on the eastern Tibetan Plateau, China[J]. Parasit Vectors, 2020, 13(1): 207.
- [6] 赵莉,张旭,张壮志,等.包虫病诊断技术与预防疫苗的研究进展[J].疾病预防控制通报,2013,28(2): 84-87, 94.
- [7] 盖文燕,王君玮,王娟,等.我国主要动物源性寄生虫病检测技术研究进展[J].中国动物检疫,2013,30(12): 15-18.
- [8] 孙雨,王晓英,董浩,等.牛羊包虫病实验室诊断技术的研究进展[J].中国草食动物科学,2016,36(1): 49-52.

- [9] 李婷,杨坤.等温扩增技术在寄生虫及其他病原体检测中的应用[J].中国血吸虫病防治杂志,2018,30(2): 232-236.
- [10] 李婷,刘燕红,赵松,等.重组酶介导的核酸等温扩增荧光法快速检测日本血吸虫感染性钉螺[J].中国血吸虫病防治杂志,2019,31(2): 109-114, 120.
- [11] 倪碧娟,吴小珉,刘燕红,等.重组酶介导的隐孢子虫属特异性等温核酸扩增方法的建立及评价[J].中国血吸虫病防治杂志,2019,31(4): 388-392.
- [12] 张强,丁昕,吴小珉,等.重组酶介导的华支睾吸虫特异性核酸等温扩增方法的建立及初步评价[J].中国血吸虫病防治杂志,2019,31(5): 468-473.
- [13] Wang Q, Yang L, Wang Y, et al. Disease burden of echinococcosis in Tibetan communities-A significant public health issue in an underdeveloped region of western China[J]. Acta Trop, 2020, 203: 105283.
- [14] 梁静,薛志强,李学兵,孙旭峰.2011-2018年宜兴市棘球绦虫监测[J].中国血吸虫病防治杂志,2019,31(6): 638-640.
- [15] Gorgani-Firouzjaee T, Kalantrai N, Ghaffari S, et al. Genotype characterization of livestock and human cystic echinococcosis in Mazandaran province, Iran[J]. J Helminthol, 2019, 93(2): 255-259.
- [16] Shahnazi M, Hejazi H, Salehi M, et al. Molecular characterization of human and animal *Echinococcus granulosus* isolates in Isfahan, Iran[J]. Acta Trop, 2011, 117(1): 47-50.
- [17] Mandal S, Mandal MD. Human cystic echinococcosis: epidemiologic, zoonotic, clinical, diagnostic and therapeutic aspects[J]. Asian Pac J Trop Med, 2012, 5(4): 253-260.
- [18] 徐祥珍,金小林,李健,等.环介导等温扩增技术检测细粒棘球绦虫DNA的初步研究[J].中国血吸虫病防治杂志,2011,16(5): 558-560, 565.
- [19] Moradi M, Meamar AR, Akhlaghi L, et al. Detection and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* mitochondrial DNA in serum and formalin-fixed paraffin embedded cyst tissue samples of cystic echinococcosis patients[J]. PLoS One, 2019, 14(10): e0224501.

【收稿日期】 2020-03-15 【编辑】 汪伟

(上接第339页)

- by a species-specific probe[J]. Mol Biochem Parasitol, 1991, 44(1): 73-80.
- [16] 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.
- [17] 张利娟,徐志敏,郭婧怡,等.2018年全国血吸虫病疫情通报[J].中国血吸虫病防治杂志,2019,31(6): 576-582.
- [18] 邹洋,王磊,李小丽,等.北京市6例输入性曼氏血吸虫病临床特点分析[J].中国血吸虫病防治杂志,2017,29(2): 150-154.
- [19] 邹洋,齐志群,冯曼玲,等.输入性曼氏血吸虫病临床分析[J].中国热带医学,2011,11(2): 250-252.
- [20] 易平,袁里平,王璋华,等.184例疑似输入性埃及血吸虫病病

例回顾性调查[J].中国血吸虫病防治杂志,2011,23(4): 441-442.

- [21] Ferrer E, Villegas B, Mughini-Gras L, et al. Diagnostic performance of parasitological, immunological and molecular tests for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in a community of low transmission in Venezuela[J]. Acta Trop, 2020, 204: 105360.
- [22] Hamburger J, Xin XY, Ramzy RM, et al. A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with bilharzia parasites (*Schistosoma mansoni*) from very early prepatency[J]. Am J Trop Med Hyg, 1998, 59(6): 872-876.

【收稿日期】 2020-03-07 【编辑】 汪伟