

# 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

张强<sup>1,2</sup>, 丁昕<sup>1,2</sup>, 吴小珉<sup>1,2</sup>, 刘燕红<sup>3</sup>, 刘剑峰<sup>1,2</sup>, 徐祥珍<sup>1,2</sup>, 应清界<sup>3</sup>, 曹俊<sup>1,2</sup>, 戴洋<sup>1,2\*</sup>

**[摘要]** **目的** 建立一种可用于华支睾吸虫检测的重组酶介导的等温核酸扩增方法(RAA)。**方法** 以华支睾吸虫 18S rRNA 基因序列作为靶序列,设计、合成、筛选特异性引物和探针,建立快速检测华支睾吸虫的荧光 RAA 检测方法。分别以含不同拷贝数 DNA 片段的重组质粒和不同浓度华支睾吸虫基因组 DNA 为模板进行荧光 RAA 扩增,评价其检测敏感性;分别以似蚓蛔线虫、细粒棘球绦虫、日本血吸虫、十二指肠钩虫、曼氏血吸虫基因组 DNA 为模板进行荧光 RAA 扩增,评价其检测特异性;通过抽提含华支睾吸虫虫卵的粪便及含囊蚴的淡水鱼肉样本 DNA 并进行荧光 RAA 扩增,初步评价其检测现场样本的能力。**结果** 成功建立了华支睾吸虫检测荧光 RAA 法,其可在 39 °C 20 min 内实现对华支睾吸虫 DNA 的特异性扩增。以含不同拷贝数 DNA 片段的重组质粒为模板,该方法最低检出限为 10 拷贝/μL;以不同浓度华支睾吸虫基因组 DNA 为模板,该方法最低检出限为 3 pg/μL;以似蚓蛔线虫、细粒棘球绦虫、日本血吸虫、十二指肠钩虫及曼氏血吸虫基因组 DNA 为模板,检测结果均为阴性。该方法可成功检出感染华支睾吸虫的人体、大鼠粪便样本以及麦穗鱼样本,具备较好的现场样本检测能力。**结论** 成功建立了一种简便、快速、敏感、特异的可用于华支睾吸虫检测的 RAA 法。

**[关键词]** 华支睾吸虫;核酸等温扩增;重组酶;检测效能

**[中图分类号]** 383.22 **[文献标识码]** A

## Establishment and preliminary evaluation of recombinase aided isothermal amplification (RAA) assay for specific nucleic acid detection of *Clonorchis sinensis*

ZHANG Qiang<sup>1,2</sup>, DING Xin<sup>1,2</sup>, WU Xiao-Min<sup>1,2</sup>, LIU Yan-Hong<sup>3</sup>, LIU Jian-Feng<sup>1,2</sup>, XU Xiang-Zhen<sup>1,2</sup>, YING Qing-Jie<sup>3</sup>, CAO Jun<sup>1,2</sup>, DAI Yang<sup>1,2\*</sup>

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, Wuxi 214064, China; 2 Public Health Research Center, Jiangnan University, China; 3 Jiangsu Qitian Gene Technology Co., Ltd., China

\* Corresponding author

**[Abstract]** **Objective** To establish a recombinase aided isothermal amplification (RAA) assay for detection of *Clonorchis sinensis*. **Methods** The 18S ribosomal RNA (18S rRNA) sequence of *C. sinensis* was used as the target sequence, and specific primers and probes were designed, synthesized and screened to establish a rapid fluorescent RAA assay for the detection of *C. sinensis*. Then, the sensitivity of the fluorescent RAA assay was evaluated using the recombinant plasmids containing various copy numbers of DNA fragments and *C. sinensis* genomic DNA at various concentrations, and the specificity of the fluorescent RAA assay was evaluated using the genomic DNA of *Ascaris lumbricoides*, *Echinococcus granulosus*, *Schistosoma japonicum*, *Ancylostoma duodenale* and *S. mansoni* as templates. DNA samples were extracted from the feces containing *C. sinensis* eggs and freshwater fish containing metacercaria for the fluorescent RAA assay, and the performance for detection of *C. sinensis*-infected samples was preliminarily assessed in the field. **Results** A fluorescent RAA assay for detection of *C. sinensis* was successfully established,

**[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与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(无锡 214064);2 江南大学公共卫生研究中心;3 江苏省奇天生物科技有限公司

**[作者简介]** 张强,男,硕士,医师。研究方向:寄生虫病防治

\* 通信作者 E-mail: 15951581011@163.com

**[数字出版日期]** 2019-10-16 16:13:54

**[数字出版网址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1374.R.20191016.1402.002.html>

which was feasible for specific amplification of *C. sinensis* genomic DNA at 39 °C within 20 min. The lowest detection limit was 10 copies/ $\mu$ L if the recombinant plasmid containing various copy numbers of DNA fragments was used as a template, and the lowest detection limit was 3 pg/ $\mu$ L if the *C. sinensis* genomic DNA at various concentrations served as a template. All detections were negative if the genomic DNA of *A. lumbricoides*, *E. granulosus*, *S. japonicum*, *A. duodenale*, and *S. mansoni* was used as templates. In addition, the fluorescent RAA assay showed a high performance for the detection of *C. sinensis*-infected samples in the field, which successfully detected *C. sinensis*-infected human and rat fecal samples and *Pseudorasbora parva* samples. **Conclusion** A fluorescent RAA assay is successfully established, which is simple, rapid, sensitivity and specific for detection of *C. sinensis*.

**[Key words]** *Clonorchis sinensis*; Isothermal nucleic acid amplification; Recombinase; Detection efficiency

华支睾吸虫病是一种由华支睾吸虫感染人和哺乳动物所引起的重要食源性寄生虫病。华支睾吸虫成虫寄生于人体肝胆管内,造成胆管扩张及上皮增生,引发胆管炎、胆结石及肝硬化等,严重时可引起胆管癌<sup>[1]</sup>。目前,全球有1 500万~2 000万华支睾吸虫感染者,主要分布在中国、日本、朝鲜半岛、越南和东南亚国家。我国是全球华支睾吸虫病危害最严重的国家。第三次全国人体重要寄生虫病现状调查结果显示,我国有18个省份发现存在华支睾吸虫感染,加权感染率达0.47%<sup>[2]</sup>。

目前,华支睾吸虫感染检测主要涉及两个方面:一是用于临床诊断及流行病学调查的人群及保虫宿主(猫、狗等)体内华支睾吸虫虫卵检测;另一个是用于食品安全风险监测的淡水鱼体内华支睾吸虫囊蚴检测。其采用的方法均基于病原学检查方法,即利用显微镜在粪便中检查虫卵(直接涂片法、Kato-Katz法等)或者在鱼体中检查囊蚴(压片法、消化法等)<sup>[3-4]</sup>。尽管该方法具有操作简单、成本低廉且易于现场使用等优势,但其检测敏感性较低,且要求检测人员具备相关专业背景知识。近年来建立的基于PCR技术的华支睾吸虫感染核酸检测方法具有敏感性和特异性均较高等优势,但对人员、设备及实验场所要求较高,同时存在检测时间较长(一般2 h左右)等不足。因此,研究开发快速、灵敏且操作简便的华支睾吸虫感染核酸检测方法是目前研究的热点。

重组酶介导的等温核酸扩增技术(Recombinase aided amplification, RAA)是一种新型等温核酸快速扩增方法,其可在恒温条件下(一般37~42 °C)实现对核酸快速扩增及检测,具备操作简单、反应快速、引物设计简单等特点,已成功应用于疟原虫、日本血吸虫、病毒、细菌等病原体检测,均显示了较好的敏感性和特异性<sup>[5-9]</sup>。本研究拟针对华支睾吸虫特异性核酸序列,建立基于RAA的核酸检测技术,并对其检测敏感性、特异性以及检测粪便、鱼肉等样本的能力进行评

价,旨在为华支睾吸虫核酸检测提供一种新的手段。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

1.1 材料来源 含有华支睾吸虫囊蚴的麦穗鱼采自广西横县华支睾吸虫病流行区,人工消化法分离囊蚴后实验室保存备用;华支睾吸虫成虫、日本血吸虫成虫、曼氏血吸虫成虫、似蚓蛔线虫虫卵、十二指肠钩蚴、细粒棘球绦虫棘球蚴、华支睾吸虫虫卵阳性人体粪便及大鼠粪便样本均由国家卫生健康委员会寄生虫病预防与控制技术重点实验室提供。

1.2 主要仪器设备 QT-RAA-F1620便携式恒温核酸检测仪和QT-RAA-B6100恒温震动混匀仪购自江苏奇天基因生物科技有限公司;离心机购自Eppendorf公司;-80 °C超低温冰箱购自海尔公司;NanoDrop 2000核酸蛋白浓度测定仪购自Thermo fisher公司;PCR仪购自Eppendorf公司。

1.3 主要试剂 QIAamp PowerFecal粪便微生物DNA提取试剂盒与DNeasy Blood & Tissue组织核酸提取试剂盒购自凯杰企业管理有限公司;海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒和高纯度质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;RAA核酸扩增反应单元购自江苏奇天基因生物公司;琼脂糖购自北京索莱宝科技有限公司;100 bp DNA Ladder购自MBI公司;RAA引物和探针由生工生物工程有限公司合成。

### 2 方法

2.1 核酸提取 采用QIAamp PowerFecal粪便微生物DNA提取试剂盒提取华支睾吸虫虫卵阳性人体和大鼠粪便基因组DNA、似蚓蛔线虫虫卵基因组DNA,操作按试剂盒说明书进行。采用DNeasy Blood & Tissue组织核酸提取试剂盒提取华支睾吸虫成虫、日本血吸虫成虫、曼氏血吸虫成虫、十二指肠钩蚴、细粒棘球绦虫棘球蚴核酸,操作参照试剂盒说明书进行。采用海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒提取含华支

辜吸虫囊蚴的麦穗鱼样本DNA,操作参照试剂盒说明书进行。所有抽提的DNA样本测定浓度后,-80℃保存备用。

## 2.2 RAA方法的建立

**2.2.1 特异性序列筛选、引物和探针设计** 根据文献[10]中的方法,选择华支辜吸虫18S rRNA基因序列作为检测靶序列,在GenBank数据库中查找全基因序列,采用DNAMAN 7.0软件进行同源性分析,筛选出华支辜吸虫高度保守序列作为本研究RAA检测靶标。根据RAA引物探针设计原理,应用Amplifx软件设计特异性扩增靶序列的上、下游引物及探针,筛选获得的最佳引物及探针序列为:上游引物:5'-TCAT-TACAGTACACAAAGCCCAAACACCTCAG-3',下游引物:5'-GCTCCACCGTAGGCAGACAACGCTGCAG-CATG-3';探针序列为:5'-CGTCATGCCCGTT-GTTCTTGCAGCCTTGCC(FAM-dT)G(THF)C(BHQ1-dT)AGGGCGGAGCGATTCT-3'(其中FAM为荧光报告基因,THF为四氢呋喃残基,BHQ1为荧光淬灭基因)。

**2.2.2 RAA基础反应体系的建立** 以华支辜吸虫基因组DNA为模板,配置RAA基础反应体系:反应缓冲液25 μL、正向引物(0.1 mmol/L)2 μL、反向引物(0.1 mmol/L)2 μL、灭菌双蒸水17.5 μL。混匀后分装46.5 μL混合液于反应单元冻干粉中,将复溶的反应单元手弹混匀,瞬时离心。向反应单元管盖上加入2.5 μL乙酸镁溶液(280 mmol/L),然后向反应单元中加入1 μL华支辜吸虫基因组DNA(浓度为30 ng/μL),盖上盖子,置于QT-RAA-B6100震荡混匀仪中,37℃反应30 min。反应结束后将反应管取出,向扩增产物中加入50 μL 1:1酚/氯仿,振荡混匀,12 000 × 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,置于紫外灯下观察扩增结果。

**2.2.3 荧光RAA法基础反应体系的建立** 按荧光RAA法检测试剂盒说明书配制反应体系。总反应体系为50 μL,包括25 μL反应缓冲液、15.7 μL双蒸水、2.1 μL正向引物(420 nmol/L)、2.1 μL反向引物(420 nmol/L)、0.6 μL探针(120 nmol/L),混匀后加至RAA反应单元冻干粉中,将复溶的反应单元手弹混匀,瞬时离心。向反应单元管盖中加入2.5 μL醋酸镁溶液(280 mmol/L),然后加入2 μL华支辜吸虫基因组DNA(浓度为30 ng/μL)于反应单元中。将以上反应体系置于QT-RAA-B6100震荡混匀仪中震荡混匀,结束后

置于QT-RAA-F1620荧光检测仪中39℃反应20 min,每20 s采集1次荧光值。实验结束后,根据QT-RAA-F1620荧光检测仪的阳性判定方法,斜率值 $K \geq 20$ 时判定为阳性, $K < 20$ 时判定为阴性。

## 2.3 荧光RAA法敏感性评价

**2.3.1 以不同拷贝数重组质粒为模板** 以上述高度保守序列作为检测目的基因,TA克隆入质粒载体,目的片段长度为223 bp,重组质粒转化入大肠埃希菌DH5α培养并提取质粒,采用超微量紫外分光光度计进行浓度测定并进行拷贝数计算,并经梯度稀释得到不同拷贝数的重组质粒,分别为 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 拷贝/μL。以此为模板进行荧光RAA法检测,评价其灵敏度。

**2.3.2 以不同浓度华支辜吸虫基因组DNA为模板** 测定抽提的华支辜吸虫基因组DNA浓度后,进行 $10^0$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 倍梯度稀释,得到不同浓度的DNA模板样本,以此为模板进行荧光RAA法扩增,评价其检测敏感性。

**2.4 荧光RAA法特异性评价** 分别以华支辜吸虫、似蚓蛔线虫、细粒棘球绦虫、日本血吸虫、十二指肠钩虫、曼氏血吸虫基因组DNA为模板,进行荧光RAA法检测,评价其检测特异性。

**2.5 荧光RAA法检测粪便及鱼肉样本效果评价** 分别以抽提的含华支辜吸虫虫卵的病人粪便、大鼠粪便以及含华支辜吸虫囊蚴的麦穗鱼组织DNA为模板进行荧光RAA法扩增,初步评价该方法检测粪便及鱼肉样本的效果。

## 3 伦理学声明

本研究获得江苏省血吸虫病防治研究所伦理审查委员会批准通过。

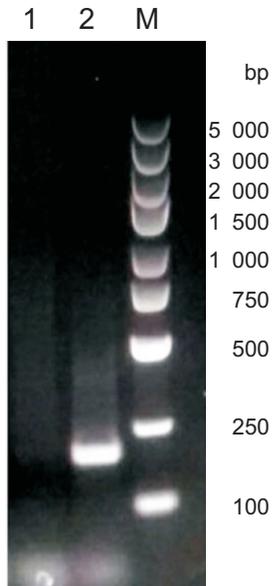
## 结 果

### 1 以华支辜吸虫DNA为模板的基础RAA扩增结果

以华支辜吸虫基因组DNA为模板进行RAA基础反应扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下可见清晰的特异性条带,长度为196 bp(图1)。

### 2 以华支辜吸虫DNA为模板的荧光RAA法扩增结果

以华支辜吸虫基因组DNA为模板进行荧光RAA反应,重复检测3次,均在5 min内即开始出现阳性扩增(图2), $K$ 值分别为230、300、300,且阴性对照无扩增。

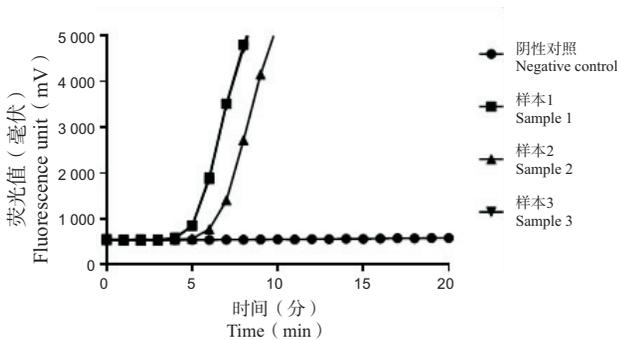


注:1 阴性对照;2 华支睾吸虫基因组 DNA;M DNA 分子质量标志物

Note: 1 Negative control; 2 *Clonorchis sinensis* genomic DNA; M DNA molecular marker

图1 华支睾吸虫基因组 RAA 琼脂糖电泳结果

Fig. 1 Result of agarose electrophoresis using *Clonorchis sinensis* genomic DNA as templates



注:样本 1、2 均为华支睾吸虫基因组 DNA

Note: Samples 1 and 2 are both *Clonorchis sinensis* genomic DNA

图2 以华支睾吸虫基因组 DNA 为模板的荧光 RAA 法扩增结果

Fig. 2 Result of fluorescent RAA amplification using *Clonorchis sinensis* genomic DNA as templates

### 3 荧光 RAA 法检测敏感性

3.1 以重组质粒为模板 随着拷贝数的降低, RAA 起峰时间逐渐推迟(图 3), 浓度由低到高 K 值依次为 25、40、300、460、580、760、900。最低可检测到含有 10 拷贝/ $\mu\text{L}$  重组质粒的荧光信号, 表明该方法的检测灵敏度可达 10 拷贝/ $\mu\text{L}$  重组质粒。

3.2 以华支睾吸虫基因组为模板 将提取的华支睾吸虫成虫基因组(浓度为 30 ng/ $\mu\text{L}$ )按 10 倍梯度稀释至 0.3 pg/ $\mu\text{L}$ , 以此为模板进行荧光 RAA 法扩增。随

着基因组浓度的降低, RAA 起峰时间逐渐延长(图 4), 浓度由低到高 K 值依次为 100、240、350、560。当华支睾吸虫基因组 DNA 浓度为 3 pg/ $\mu\text{L}$  时, 10 min 内仍可出现阳性扩增, 灵敏度可达 3 pg/ $\mu\text{L}$ 。

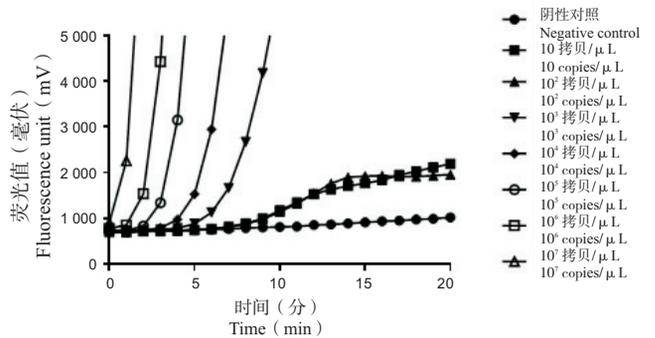


图3 以不同拷贝数重组质粒为模板的荧光 RAA 法检测结果  
Fig. 3 Results of RAA fluorescence detection using different copy number recombinant plasmids as templates

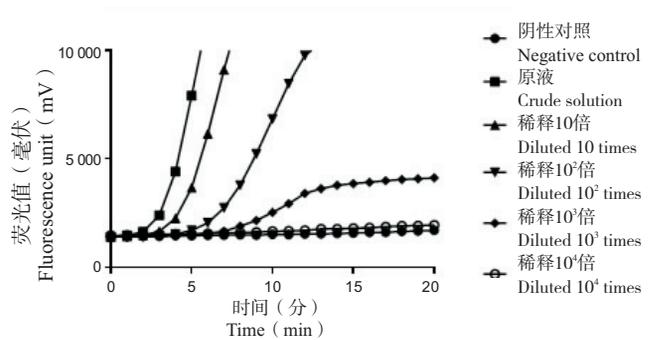


图4 以不同浓度基因组 DNA 为模板的荧光 RAA 法检测结果

Fig. 4 Results of RAA fluorescence detection using different concentrations genomic DNA as templates

### 4 荧光 RAA 法检测特异性

分别以华支睾吸虫、似蚓蛔线虫、细粒棘球绦虫、日本血吸虫、十二指肠钩虫、曼氏血吸虫基因组 DNA 为模板, 进行荧光 RAA 法检测。华支睾吸虫基因组 DNA 在 10 min 内即可出现明显阳性扩增(图 5), K 值为 170。而其他 5 种寄生虫均无荧光值出现, 表明该方法具有良好的特异性。

### 5 荧光 RAA 法检测粪便及鱼肉组织效果

提取含华支睾吸虫虫卵的病人粪便、大鼠粪便以及含有华支睾吸虫囊蚴的麦穗鱼基因组 DNA, 通过荧光 RAA 法进行检测。3 个阳性样本均在 10 min 内出现阳性扩增(图 6), 病人粪便、大鼠粪便、鱼肉组织阳性样本的 K 值分别为 230、120、280。提示该方法可用于华支睾吸虫阳性粪便及鱼肉样本检测。

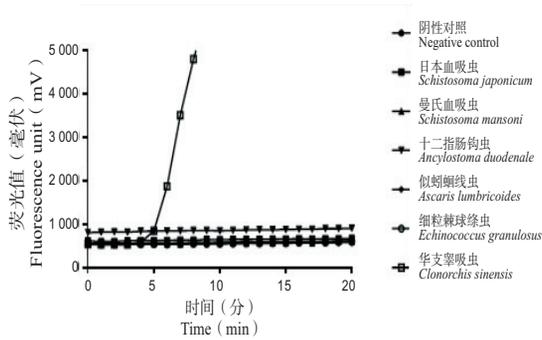


图5 荧光RAA法特异性检测结果

Fig. 5 Results of RAA fluorescence detection specificity

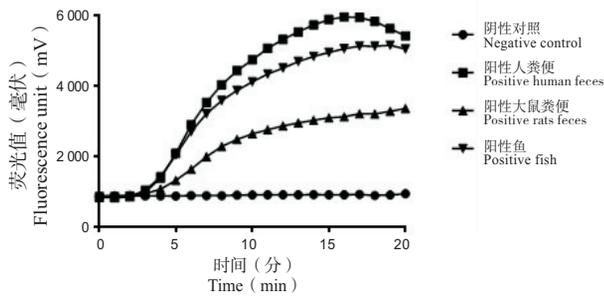


图6 荧光RAA法检测阳性样本结果

Fig. 6 Results of positive samples detection using RAA fluorescence method

## 讨论

本研究建立了一种可用于华支睾吸虫虫卵和囊蚴检测的荧光RAA法,该方法能在39℃恒温下5~20 min完成检测,具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性好以及实时观察检测过程等优点。

传统的病原学检测技术是目前用于华支睾吸虫感染检测的“金标准”,具有操作简便、快速、经济,适宜用于大规模流行病学普查等优点,但也存在漏诊、误诊和工作量大等缺陷<sup>[3-4]</sup>。如用于检测华支睾吸虫虫卵的Kato-Katz法,一方面由于华支睾吸虫虫卵极小,在检测过程中易漏检;另一方面由于虫卵排出具有一定周期性<sup>[11]</sup>,通常需连续3 d进行多次粪便采集和检测,故极大地降低了专业技术人员及被调查对象的依从性。此外,在淡水鱼体内华支睾吸虫囊蚴检测中,传统压片法和消化法虽对现场检测设备及环境条件要求低,但前者检出率较低、后者耗时较长(8~12 h),加之鱼体内可能存在多种囊蚴寄生(如东方次睾吸虫、钩棘单睾吸虫、台湾棘带吸虫等),形态鉴别难度较大,故易发生误判。因此,简便、快速的核酸检测技术是华支睾吸虫检测的理想方法。近年来建立的环介导等温核酸扩增(LAMP)法克服了传统PCR技

术反应时间长及结果读取烦琐等缺点,具有操作简便、结果易于判读等优点,已用于华支睾吸虫检测<sup>[12]</sup>;但该技术需采用多对引物且对靶基因要求较高,另外假阳性率也较高<sup>[13-14]</sup>。本研究采用的荧光RAA检测技术具有完全独立知识产权,实现了在39℃恒温下的核酸快速扩增,具备操作简单、反应快速、引物设计简单、实时观察获取结果等优势<sup>[15-16]</sup>。

在华支睾吸虫感染分子诊断中,较常用的引物靶基因有ITS1、ITS2以及18S rRNA,这些基因已被证实为鉴定华支睾吸虫可靠的分子遗传标记物<sup>[10, 12, 17]</sup>。本研究选取华支睾吸虫18S rRNA基因设计特异性引物和探针,建立华支睾吸虫实时荧光RAA反应体系。分别以重组质粒和基因组DNA为模板对该方法进行敏感性评价,结果表明灵敏度可分别达到10拷贝/ $\mu\text{L}$ 和3 pg/ $\mu\text{L}$ 。Rahman等<sup>[18]</sup>以cox1基因为靶标,分别设计LAMP和PCR引物探针进行华支睾吸虫检测,结果表明LAMP检测灵敏度为100 fg/ $\mu\text{L}$ ,PCR检测灵敏度为10 pg/ $\mu\text{L}$ 。Chen等<sup>[12]</sup>以华支睾吸虫ITS2基因为目标序列建立华支睾吸虫LAMP检测方法,其灵敏度为10 fg/ $\mu\text{L}$ ;而用于对比的PCR法灵敏度为10 pg/ $\mu\text{L}$ 。Le等<sup>[19]</sup>以NAD2基因为靶序列建立多重PCR检测方法,其灵敏度为0.78 ng/ $\mu\text{L}$ 。本研究建立的华支睾吸虫RAA检测法灵敏度高于PCR法,略低于LAMP法。鉴于LAMP法虽然灵敏度高,但出现假阳性的概率也较大<sup>[20]</sup>,故后续研究中我们将采用3种方法对同一批样本进行检测,以比较其灵敏度。在特异性评价方面,本研究以似蚓蛔线虫、细粒棘球绦虫、日本血吸虫、十二指肠钩虫、曼氏血吸虫基因组DNA为模板,RAA扩增结果均为阴性,提示该方法具有较高特异性;但受样本来源限制,未能就其他吸虫如东方次睾吸虫、猫后睾吸虫、布氏姜片虫等开展检测。为初步评价该方法用于现场样本的检测能力,本研究还对华支睾吸虫感染病人粪便及大鼠粪便样本、淡水鱼肉样本进行了检测,结果均为阳性,初步表明该方法具备现场样本检测的潜力。

综上所述,本研究成功建立了一种针对华支睾吸虫检测的RAA技术,为华支睾吸虫病诊断及淡水鱼体内华支睾吸虫感染监测提供了一种新的技术手段。后续研究工作中,我们将通过对其他多种吸虫进行检测以进一步评价该方法的特异性,同时开展粪便及淡水鱼样本中华支睾吸虫检测的现场评价研究,从而为该方法的后继应用提供基础数据。

## 【参考文献】

- [1] 王彩琴, 余新炳, 李学荣. 华支睾吸虫感染与胆管癌发生发展关系的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2015, 33(2): 142-146.
- [2] 周晓农. 2015年全国人体重点寄生虫病现状调查报告[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 73-85.
- [3] 蒋守富, 张小萍, 何艳燕. 食品寄生虫快速检测技术的应用进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(1): 95-100.
- [4] Keiser J, Utzinger J. Food-borne trematodiasis [J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22(3): 466-483.
- [5] 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.
- [6] 郑伟, 麻慧君, 鲁婕, 等. 实时荧光重组酶介导核酸扩增在疟原虫快速检测中的应用研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(2): 295-296, 304.
- [7] Wang QY, Li F, Shen XX, et al. A reverse-transcription recombinase-aided amplification assay for the rapid detection of the far-eastern subtype of tick-borne encephalitis virus [J]. Biomed Environ Sci, 2019, 32(5): 357-362.
- [8] 黄纪徽, 吴山楠, 王丹云, 等. 虾肝肠胞虫实时荧光RAA快速检测方法的建立[J]. 养殖与饲料, 2018, 17(11): 13-16.
- [9] 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.
- [10] 李佳, 陈春红, 张仁利, 等. 华支睾吸虫 ICT 和 PCR 检测方法的建立及其应用研究[J]. 中国热带医学, 2016, 16(12): 1155-1158.
- [11] 高广汉, 王运章, 许汴利. 华支睾吸虫排卵量的动态观察[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1992, 5(2): 128-129.
- [12] Chen Y, Wen T, Lai DH, et al. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Clonorchis sinensis* from its first intermediate hosts, freshwater snails [J]. Parasitology, 2013, 140(11): 1377-1383.
- [13] 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.
- [14] 罗力涵, 张波. 环介导等温扩增技术及其在传染性疾病预防中的应用[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2014, 37(1): 68-72.
- [15] Li J, Macdonald J. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes [J]. Biosens Bioelectron, 2015, 64: 196-211.
- [16] 吕蓓, 程海荣, 严庆丰, 等. 用重组酶介导扩增技术快速扩增核酸[J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(10): 983-988.
- [17] 陈莹, 杨齐, 吴尚为. PCR 及其衍生技术在华支睾吸虫检测中的应用[J]. 热带医学杂志, 2015, 15(8): 1154-1157.
- [18] Rahman S, Song HB, Jin Y, et al. Application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting *cox1* gene for the detection of *Clonorchis sinensis* in human fecal samples [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2017, 11(10): e0005995.
- [19] Le TH, Van De N, Blair D, et al. *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*: Development of a mitochondrial - based multiplex PCR for their identification and discrimination [J]. Exp Parasitol, 2006, 112(2): 109-114.
- [20] 张燕, 董惠芬, 蒋明森, 等. 血吸虫分子生物学检测技术研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2017, 29(6): 798-801.
- [43] 闵霄, 吴孝兵. 安徽扬子鳄野生栖息地水域浮游和底栖动物调查及其与扬子鳄种群分布关系探讨[J]. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 2018, 41(4): 350-356.
- [44] 于菁菁, 崔丽娟, 雷茵茹, 等. 湖南东洞庭湖国家级自然保护区管理现状浅析[J]. 湿地科学与管理, 2015, 11(4): 39-41.
- [45] 张季, 陈蕾. 湖北湿地保护存在的问题及对策[J]. 人民长江, 2018, 49(23): 43-46.
- [46] 李胜明. 我国血吸虫病防治法制建设的现实状况与突出问题分析及对策[J]. 中国卫生法制, 2006, 15(1): 23-26.
- [47] 雷正龙, 周晓农. 消除血吸虫病——我国血吸虫病防治工作的新目标与新任务[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2015, 27(1): 1-4.
- [48] Wang L, Utzinger J, Zhou XN. Schistosomiasis control: experiences and lessons from China [J]. Lancet, 2008, 372(9652): 1793-1795.
- [49] 周晓农. 我国血吸虫病的监测与预警[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2009, 21(5): 341-344.
- [50] Wang X, Wang W, Wang P. Long-term effectiveness of the integrated schistosomiasis control strategy with emphasis on infectious source control in China: a 10-year evaluation from 2005 to 2014 [J]. Parasitol Res, 2017, 116(2): 521-528.
- [51] 胡广汉, 许静, 曹淳力, 等. 我国血吸虫病消除阶段健康教育与健康促进面临的挑战及对策[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2018, 30(2): 13-16, 19.

【收稿日期】 2019-07-11 【编辑】 邓瑶

【收稿日期】 2019-09-11 【编辑】 汪伟

(上接第462页)