

钩虫检测技术研究进展

梁家瑞¹, 徐斌¹, 胡薇¹, 郑彬^{1,2*}

1. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所(国家热带病研究中心), 国家卫生健康委员会寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织热带病合作中心, 科技部国家级热带病国际研究中心, 上海 200025;
2. 上海交通大学医学院-国家热带病研究中心全球健康学院, 上海 200025

摘要: 钩虫作为土源性线虫种之一, 其感染宿主后引起的钩虫病广泛流行于热带、亚热带的发展中国家。钩虫对人体健康造成的危害主要包括贫血、消化道相关症状等, 女性感染后还可引起停经、流产, 婴幼儿感染可致生长发育迟缓。随着经济发展与大规模药物管理策略的实施, 人体钩虫感染率已持续下降但仍存在大量轻度感染病例, 临床症状不明显, 易造成漏诊、误诊。部分钩虫虫种属人畜共患寄生虫, 可造成猫犬等动物的大规模感染, 加剧人体钩虫感染风险。因此探寻灵敏性高并能快速鉴别钩虫虫种的检测技术至关重要。本文将对现有的钩虫检测技术进行综述并对其应用前景进行展望, 为现阶段的钩虫检测提供思路。

关键词: 钩虫; 检测; 虫种鉴别

中图分类号: R383.1+3 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2023)04-413-07

DOI: 10.13604/j.cnki.46-1064/r.2023.04.18

Research progress of hookworm detection technology

LIANG Jia-rui¹, XU Bin¹, HU Wei¹, ZHENG Bin^{1,2}

1. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention (Chinese Center for Tropical Diseases Research); National Health Council Key Laboratory of Parasite and Vector Biology; WHO Collaborating Center for Tropical Diseases; National Center for International Research on Tropical Diseases, Ministry of Science and Technology, Shanghai 200025, China; 2. School of Global Health, Chinese Center for Tropical Diseases, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Corresponding author: ZHENG Bin, E-mail: zhengbin@nipd.chinacdc.cn

Abstract: As one of the species of soil-transmitted helminths (STH), hookworm infection is widely prevalent in tropical and subtropical developing countries. Hookworm is harmful to human health mainly including anemia, digestive tract symptoms, female infection can also cause menopause, abortion, infection in infants and young children can lead growth retardation. With the development of economy and implementation of mass drug administration strategies, the infection of hookworm in human body has decreased continuously, but there are still a large number of mild infection cases which clinical symptoms are not obvious, easy to cause missed diagnosis and misdiagnosis. Several zoonotic hookworm species can cause large-scale infections in cats, dogs and other animals, so as to increase the risk of human hookworm infection. Therefore, it is important to find a highly sensitive and rapid detection techniques to identify hookworm species. In this paper, the existing detection techniques of hookworm were reviewed and their application were prospected to provide ideas for hookworm detection at present situation.

Keywords: Hookworm; detection; species identification

世界卫生组织将土源性线虫病列为被忽视的热带病(neglected tropical diseases, NTDs)之一。钩虫病作为一种土源性线虫病, 威胁着全球约5亿人口的健康, 其导致的累积经济影响严重威胁到大多数发展中国家^[1]。钩虫病主要由美洲板口线虫和十二指肠钩口线虫感染引起, 动物源性的锡兰钩虫与犬钩虫可导致人兽共患病。钩虫成虫以其口囊内的钩齿或板齿咬

附肠粘膜, 以宿主血液、淋巴液及肠粘膜为食, 咬附时会分泌多种抗凝因子造成伤口不断渗血, 再加上其存在更换咬附部位的习性, 最终导致宿主不同程度的长期慢性贫血^[2]。

近年来, 锡兰钩虫已超过十二指肠钩虫成为造成东南亚及太平洋等地区人体钩虫感染的第二大优势虫种^[3-7], 同时也是猫犬体内普遍感染的钩虫虫种^[8-9],

基金项目: 国家科技重大专项(No.2018ZX10101002-002-003)

作者简介: 梁家瑞(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 寄生虫病监测与预警。

*通信作者: 郑彬, E-mail: zhengbin@nipd.chinacdc.cn

锡兰钩虫潜在的人畜互传风险使得钩虫感染的防控难度不断提升^[10]。我国同样面临着巨大的钩虫感染负担。据 2015 年第三次全国人体重点寄生虫病现状调查报告表明,钩虫感染已超越蛔虫感染成为土源性线虫感染顺位第一的虫种^[11]。2019 年全国土源性线虫监测结果显示,钩虫感染率为 0.84% 且全部为轻度感染^[12]。我国猫犬源性的锡兰钩虫同样存在人畜互传风险^[13]。为适应目前钩虫感染现况,对钩虫检测技术的要求也在不断提高,现将目前主要运用的钩虫检测技术及其优劣性综述如下。

1 病原形态学检测

粪检查得虫卵或虫体是我国目前钩虫病患者确诊的重要依据之一^[14]。

1.1 改良加藤厚涂片法(Kato-Katz 法) 世界卫生组织目前仍推荐 Kato-Katz 法作为诊断土源性线虫病的病原学标准之一,该法是将粪样经尼龙绢过滤后,通过定量板取样,覆以甘油-孔雀绿亲水玻璃纸制备粪膜,待粪膜适度透明化后对其进行镜检,是一种定性的同时可定量估算粪样中虫卵数的检测方法。该方法具有易于操作、耗材简单、适用于现场及经济落后地区等特点。由于不同的钩虫虫种在虫卵阶段形态相似,均呈卵圆形且卵壳薄呈无色透明状,因此该方法不易对钩虫虫种进行鉴别。运用 Kato-Katz 法制片后应在 20~30 min 内完成镜检,否则会因粪膜中水分过度蒸发、涂片过度透明化等原因造成钩虫卵变形不易辨认,导致漏检、误检^[15-16]。在土源性线虫感染率和感染度整体呈下降趋势的今天,这一方法的敏感性受到了质疑。STOREY 等^[17]指出,当土源性线虫的感染率远低于 20% 时,分子诊断相较于 Kato-Katz 法更具有使用价值。并且当涂片中虫卵数较少时,该法对检测人员的专业能力要求较高,否则很容易在实际镜检工作中造成漏检、误检^[18]。

1.2 浮聚法 浮聚法是利用比重较大的溶液(常使用饱和盐水)使比重相对较轻的钩虫卵上浮,用玻片对漂浮在液面上的虫卵进行粘附,而后对玻片进行镜检,静置与放置玻片的顺序对于钩虫卵检出率而言并无影响^[19]。但在现实工作中发现,传统载玻片对钩虫卵的粘附效果并不理想。刘晓明等^[20]研究发现,经脱脂处理后的载玻片比未经脱脂处理的载玻片粘附虫卵效果好,当同时运用两种载玻片对同一批样本进行钩虫卵检测时,检出率存在显著差别。浮聚法只可用作定性检测,无法对粪样中的虫卵进行定量,不能估算患者的感染度,因此多与 Kato-Katz 法串联以定量计算粪样虫卵数,徒增不少工作量。通过结合青霉素瓶的浮聚法可对粪样中的虫卵进行定量检测,检出率

与 Kato-Katz 法无显著差异,但将二者进行联合运用时的检出率显著高于单一检测方法的检出率^[21]。浮聚法操作简单,但由于其无法定量的特点无法独立运用,在实际工作中多与其他检测方法结合以筛选钩虫阳性样本。

1.3 试管滤纸培养法 试管滤纸培养法也称钩蚴培养法,是将少量粪样(约 0.2~0.4 g)均匀涂抹至修剪为“T”状滤纸的中上部,后将其插入盛有水的试管中,以粪便不接触水面为度,在室温条件下对粪样中的钩虫卵进行培养,常需 3~5 d。如粪样钩虫卵阳性,则可在试管底部观察到钩蚴,常作蛇形游动,虫体呈透明状。在钩蚴阶段,可根据不同幼虫的形态对钩虫虫种进行初步鉴别^[22-23]。该法所需耗材简单,但耗时耗力^[24]。

1.4 胶囊内镜检查 在临床检查中,钩虫感染者多由进行内镜检查时发现成虫得以确诊。胶囊内镜较传统内镜检查而言,具有安全无创、患者依从性较高、全程可视等特点,目前在临床诊断钩虫病方面得到了较高的认可。

CHERGUI 等^[25]通过胶囊内镜确诊了 1 例钩虫患者,该病例因缺铁性贫血入院,血液检查显示伴有嗜酸性粒细胞增多,在传统消化道内窥镜检查阴性后,最终采用胶囊内镜对该患者进行检查,发现位于小肠末端的多条钩虫成虫,得以确诊。COTON 等^[26]通过胶囊内镜确诊了 1 例常规血液检查、粪检、内镜检查均正常的钩虫感染者,在该患者的十二指肠和近端空肠发现多条钩虫。钩虫成虫的识别与鉴定仍需要相关检测者具备寄生虫形态学相关知识储备与一定的临床检测经验,否则也会有漏诊、误诊等情况的发生。

GAN 等^[27]通过开发具有卷积神经网络(convolutional neural network, CNN)的人工智能系统以自动检测胶囊内镜图像中的钩虫,实验研究显示该 CNN 系统识别钩虫的灵敏度、特异度及准确性分别可达 92.2%、91.1% 和 91.2%,且对于单条钩虫、多条钩虫及吸满血的钩虫而言,均能有效检出,尤其对于易与其余胃肠道血管病变相混淆的全血钩虫,该系统存在一定的检测优势,但该系统同样存在不足,结果误报多由黑暗、碎片、气泡、血管阴影及重叠等因素引起。HE 等^[28]构建了一种新型深度检测钩虫框架,包含 2 个 CNN 网络,分别是边缘提取网络和钩虫分类网络,用于胶囊内镜图像建模钩虫的视觉外观和管状区域,该方法的高灵敏度与准确性使之具有广泛的临床应用潜力。胶囊内镜检查可有效规避钩虫临床检测过程中存在的缺陷,但由于其检测价格高昂,因此在钩虫流行地区难以普及。

病原形态学检测中 Kato-Katz 法运用最为广泛,大部分调查研究将该方法作为钩虫检测的金标准与所建立的新检测方法进行比较。但病原学检测存在一定的局限性,因此应根据实际需要适当选择。

2 免疫学检测

钩虫是一类多细胞的古老生物,数百万年来与人类共同进化,在感染人体时会分泌多种生物分子调节宿主的免疫反应,以保证与宿主共存。钩虫感染所引起的宿主免疫应答可归结为正反调控两方面:诱导宿主产生杀伤、排除幼虫的免疫反应;诱发宿主产生有利于维持钩虫感染现况的免疫改变,最终使得钩虫与宿主达到一种平衡状态,这种免疫调节还可使宿主自身免疫性疾病发病减少或症状减轻^[29-30]。钩虫所致免疫反应的特殊性对免疫学检测技术的灵敏性和特异性提出了挑战。

2.1 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) ELISA 是指通过将受检物质(抗原或抗体)与固定的抗体或抗原结合,经过洗板去除非结合物,与酶标抗原或抗体结合后,通过与酶底物反应显色以定性或定量样本中待检物质的免疫学检测技术,广泛应用于检测宿主体液及排泄分泌物内特异性抗体或抗原,主要类型包括直接 ELISA 法、间接 ELISA 法、夹心 ELISA 法和竞争 ELISA 法等^[31]。

检测抗体的 ELISA 法已广泛应用于钩虫检测领域。SOUZA 等^[32]基于锡兰钩虫的蛋黄多克隆 IgY 抗体建立了一种可检测钩虫感染者血清样本中免疫复合物的 ELISA 法,该抗体可识别两种不同分子量的蛋白质复合物,分别为 200 000 与 40 000~50 000,该试验灵敏度为 90%,特异度为 96.7%,具有一定应用潜力。杨益等^[33]通过 ELISA 法分析比较美洲钩虫患者体内的特异性抗体,并分别以这些抗体作为检测靶,比较其诊断效能,结果显示, IgG4 与 IgG 检测的灵敏度最佳,二者不存在显著差异,是钩虫患者体内的优势抗体,但 IgG4 作为检测靶的特异性显著优于 IgG,是美洲钩虫患者体内的优势特异抗体。

粪抗原检测是肠道寄生虫病确诊的重要途径之一,不受机体免疫系统的影响,取材方便且无创伤性,较血清抗体检测而言可区分现症感染与既往感染,实现对肠道寄生虫感染的早期诊断^[34]。BALINSKY 等^[35]将基于粪抗原检测钩虫感染的直接 ELISA 法与双离心糖浮选法(double-centrifugation sugar flotation, DC-SF)进行比较,结果显示两种方法检测结果具有较好的一致性,但 DCSF 具有一定的局限性,因为粪便在乙醇中长时间保存会导致 DCSF 出现假阴性结果,相较而言,粪抗原 ELISA 法更具有应用前景。ADOLPH

等^[36]为探究犬类肠道线虫感染的最佳诊断策略,将犬尸检结果分别与被动浮选法、糖离心浮选法、粪抗原双抗体夹心 ELISA 法检测结果进行比较,结果显示粪抗原双抗体夹心 ELISA 法可发现尸检中不易被发现的隐匿线虫感染,尤其是体型较小尚未发育为成虫的犬钩虫幼虫,单独依靠病原学诊断很可能无法揭示犬类线虫的真正感染情况,因此应在浮选法的基础上加入粪抗原双抗体夹心 ELISA 法,有助于发现隐匿感染并帮助鉴别虫种。LITTLE 等^[37]研究结果表明针对粪抗原的双抗体夹心 ELISA 法可在犬类感染犬钩虫后的第 9 天有效检出,粪检查得虫卵时间则一般为犬类感染后的第 23 天,大幅度提前了病犬的检出时间。

2.2 免疫层析试条检测技术 (immunochromatographic strip, ICS) ICS 是一种将色谱层析原理与抗原抗体反应相结合的快速检测技术,以干试条的形式,实现快速、敏感、特异显色以检测样品中的待测物,其中胶体金试条检测技术由于其制备简单、检测快速等特点,在病原体检测领域得到了广泛应用^[38]。石锋等^[39]通过将美洲钩虫成虫的可溶性抗原作为包被抗原,胶体金标记 G 蛋白为检测探针,成功构建了检测美洲钩虫特异性抗体的免疫层析试条,该试条灵敏度为 88.4%,特异度为 94.9%,并将该方法与间接 ELISA 法进行比较,结果显示二者检验效能不存在显著差异。

免疫学检测技术多作为寄生虫病诊断的补充方法。将该技术应用于钩虫检测时,其敏感性和物种特异性尚存在争议。有研究表明钩虫抗原常与其他土源性线虫存在交叉反应^[40],常用于免疫学检测的 IgG 抗体对于钩虫检测而言特异性不高且 IgG 抗体阳性常表示为既往感染,无法判定是否为现症感染,因此将免疫学检测技术应用于钩虫领域有待于进一步研究与探讨。

3 分子生物学检测

分子生物学检测技术具有高灵敏性与高特异性相结合的特点,且较其余检测技术而言发展较快,新兴检测技术层出不穷,近年来在钩虫检测领域应用广泛。

3.1 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) PCR 通过程序化的改变温度实现体外核酸扩增,是整个现代分子生物学实验工作的基石。PCR 的基本工作原理是以拟扩增的 DNA 片段为模板,以一对分别与模板相互补的寡核苷酸片段为引物,在 DNA 聚合酶的作用下按半保留复制机制对靶片段实现指数倍扩增。

郑琪等^[41]根据美洲钩虫和十二指肠钩虫的线粒体 DNA 细胞色素 c 氧化酶亚基 1 (cytochrome c oxidase subunit, COX1) 分别设计 PCR 引物,通过 PCR 扩增与

测序比对,结果显示美洲钩虫与十二指肠钩虫分别特异性扩增出长度为500 bp、700 bp的条带,可有效对美洲钩虫和十二指肠钩虫进行区分。CHANG等^[42]对柬埔寨北部两个省的1 156名居民首先采用Kato-Katz法进行肠道蠕虫感染情况检查,后对阳性样本通过PCR扩增钩虫的*COX1*基因,经测序比对,发现在所有粪检钩虫卵阳性样本中,美洲钩虫占90.7%,锡兰钩虫占9.3%。刘远佳等^[43]针对锡兰钩虫的ITS1和部分5.8 S核糖体DNA保守序列设计引物,通过PCR扩增得到全长为404 bp的片段,经测序比对,该片段包括309 bp的ITS1和95 bp的5.8 S,可实现对猫源锡兰钩虫的鉴定。AUNG等^[44]通过对钩虫卵阳性粪样提取DNA,对部分ITS1、全长5.8 S、部分ITS2区域的基因序列通过PCR进行扩增与序列比对,确定了缅甸农村地区主要流行的钩虫虫种。BEZERRA-SANTOS等^[45]运用PCR对从黑耳负鼠粪样中提取的DNA进行扩增,结果表明黑耳负鼠存在犬钩虫感染情况,其作为一种新的犬钩虫宿主,可能会进一步加剧犬钩虫在城市环境中的传播,对人和动物造成潜在威胁。PCR技术还可助于发现人体犬钩虫感染的罕见病例^[46-47]。

3.2 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR - restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) PCR-RFLP是将PCR扩增产物经特异性内切酶消化后形成大小不同的酶切片段,产物通过琼脂糖凝胶电泳,可分辨各片段的大小及位置,常用以揭示物种间遗传变异或评估种间亲缘关系。

KLADKEMPETCH等^[8]运用PCR-RFLP法靶向识别钩虫的ITS区域进行犬源性及土壤源性的钩虫虫种鉴别,结果显示在79份钩虫阳性犬粪样本中,锡兰钩虫为优势虫种,占阳性样本的96.55%,犬钩虫感染比例较低为3.45%;22份土壤阳性样本全部鉴定为锡兰钩虫,经序列比对,土壤中的锡兰钩虫与感染犬的锡兰钩虫属同一基因型,提示人在与犬类密切接触时同样存在感染锡兰钩虫的风险。MULINGE等^[9]以钩虫属和狭头钩虫核糖体DNA的ITS1、ITS2、5.8 S、28 S基因序列为靶序列进行PCR扩增,对扩增产物通过PCR-RFLP检测或测序完成钩虫虫种鉴定,结果显示,肯尼亚地区犬类最常感染的钩虫虫种为犬钩虫,其次是巴西钩虫,此次调查研究中还罕见发现了犬类十二指肠钩虫感染病例。GEORGE等^[48]运用PCR-RFLP法对印度泰米尔纳德邦地区人体粪样、犬粪样及土壤进行钩虫检测及虫种鉴别以判定犬类在钩虫传播中的作用。

3.3 荧光定量PCR(quantitative PCR, qPCR) qPCR是通过采集荧光信号即时分析靶基因的拷贝数

目,并与已知量的标准品进行比较,实现对待检物质的定量检测。

汪家旭等^[49]应用SYBR Green I荧光染料建立了一种检测美洲钩虫的方法,该方法依据美洲钩虫的ITS2序列设计特异引物,将扩增产物构建重组质粒用以建立qPCR标准曲线,并将结果与PCR检测结果进行比较,显示qPCR法的灵敏度较PCR提升了约100倍,显著优于PCR法。MASSETTI等^[50]建立的多重qPCR法可检测并鉴别感染犬类的所有钩虫虫种,即巴西钩虫、锡兰钩虫、犬钩虫及狭头钩虫,该方法以这四种钩虫的ITS1核糖体DNA为靶序列设计引物,并将该方法与PCR-RFLP法进行比较,结果显示qPCR法的灵敏度显著高于PCR-RFLP法,运用所建立的多重qPCR法对尼日利亚犬体内的钩虫虫种进行鉴别,是首次在该国犬类中对巴西钩虫进行分子鉴定,检测结果显示,犬钩虫是尼日利亚犬类钩虫感染中的优势虫种,感染率约为81.3%,其次是巴西钩虫,感染率约为51.2%,并常发生这两种钩虫的合并感染。

3.4 Melting Temperature Shift(Tm-Shift) Tm-Shift是一种基因分型方法,通过在两条特异性引物5'端加入不同长度的GC序列,PCR扩增后根据熔解曲线中产物Tm值的差异完成分型^[51]。

FU等^[52]建立的锡兰钩虫和犬钩虫基于ITS71、ITS197、ITS296三个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点的Tm-Shift检测方法最低检出限分别为 5.33×10^{-6} ng/ μ L和 5.03×10^{-6} ng/ μ L,3套引物扩增后,锡兰钩虫和犬钩虫Tm值分别为88℃和86℃(ITS71)、86℃和85℃(ITS197)、84℃和85℃(ITS296),可有效检出并鉴别犬粪样中的锡兰钩虫与犬钩虫,并能弥补传统PCR检测技术无法对大量样本同时进行检测及虫种鉴别的缺陷。

3.5 环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) LAMP指可在恒温条件下,通过特殊的酶促使DNA双链完成解旋、延伸,实现体外核酸扩增,是一类分子生物技术的统称^[53]。LAMP是等温扩增的代表性技术之一,可通过两条外引物和两条内引物在60~65℃,30~60 min内完成对靶基因的扩增^[54]。

危芙蓉等^[55]根据美洲钩虫的ITS基因序列,建立了一种快速、高效的LAMP法用以检测粪样中美洲钩虫虫卵,将该方法与PCR法及Kato-Katz法进行同步样本检测,结果显示基于Kato-Katz法为标准,LAMP的灵敏度和特异度分别为95.24%和97.06%,基于PCR法为标准,LAMP的灵敏度和特异度均为100%。MUGAMBI等^[56]建立的针对美洲钩虫ITS2区域,检测

人体粪样中美洲钩虫的 LAMP 法检出限低至 0.4 fg DNA,与 Kato-Katz 法相比较,灵敏度为 97%。

分子生物学检测技术更适用于大规模药物管理后钩虫低感染度检测所需的灵敏度与特异性^[57],且可实现同时检测多种虫种^[58-59]。但分子生物学检测技术同样存在缺陷,一般需要实验室及相关专业仪器才可完成检测,现场应用存在局限性。

4 小结与展望

钩虫相关检测技术各有利弊,病原学检测技术操作简单,适用于现场,但耗时耗力且对检测人员要求较高,否则容易造成漏检、误检;免疫学检测技术可实现现场快速检测,但其敏感性和物种特异性有待于进一步讨论;分子生物学检测技术可满足当前钩虫检测的需求,但其对检测环境和设施有一定要求,现场应用存在一定的局限性。

近年来迅速发展的等温扩增技术摆脱了传统分子生物学检测技术对仪器设备的高度依赖性,以 LAMP 为代表的等温扩增检测技术已在钩虫检测领域得到应用,并做到了检测结果可视化。重组酶聚合酶核酸等温扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)、基于 CRISPR/Cas 系统的核酸检测技术等新兴检测技术在病原体相关检测取得了一定的应用优势,其灵敏性显著优于传统分子生物学检测技术并可大幅度缩短检测时间,在现阶段钩虫检测领域存在一定应用前景。此类新兴技术目前尚处研究阶段,现场应用还需进一步研究优化。

镜检仍是钩虫检测的基石,分子生物学检测技术更适用于钩虫流行现况,可在一定程度上弥补镜检的缺陷,显著改善镜检敏感性不足、耗时耗力等问题,但无法完全替代镜检^[60]。因此应根据实际情况的需求和具体研究目的选取适宜的检测技术,同步或串联将不同类型、不同特点的检测技术整合,建立更准确、高效的钩虫检测平台。

利益冲突声明 所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] BARTSCH S M, HOTEZ P J, ASTI L, et al. The global economic and health burden of human hookworm infection[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 10(9): e0004922.
- [2] LOUKAS A, HOTEZ P J, DIEMERT D, et al. Hookworm infection[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16088.
- [3] BUI K L, NGUYEN T H, DUONG H D, et al. *Ancylostoma ceylanicum* infections in humans in Vietnam[J]. *Parasitol Int*, 2021, 84: 102405.
- [4] STRACKE K, JEX A R, TRAUB R J. Zoonotic ancylostomiasis: an update of a continually neglected zoonosis[J]. *Am J Trop Med Hyg*,

2020, 103(1): 64-68.

- [5] O'CONNELL E M, MITCHELL T, PAPAIAKOVU M, et al. *Ancylostoma ceylanicum* hookworm in Myanmar refugees, Thailand, 2012-2015[J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24(8): 1472-1481.
- [6] BRADBURY R S, HUI S F, HARRINGTON H, et al. *Ancylostoma ceylanicum* hookworm in the Solomon Islands[J]. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23(2): 252-257.
- [7] GERBER V, LE GOVIC Y, RAMADE C, et al. *Ancylostoma ceylanicum* as the second most frequent hookworm species isolated in France in travellers returning from tropical areas[J]. *J Travel Med*, 2021, 28(6): taab014.
- [8] KLDKEMPETCH D, TANGTRONGSUP S, TIWANANTHAGORN S. *Ancylostoma ceylanicum*: the neglected zoonotic parasite of community dogs in Thailand and its genetic diversity among Asian countries[J]. *Animals (Basel)*, 2020, 10(11): 2154.
- [9] MULINGE E, NJENGA S M, ODONGO D, et al. Molecular identification of zoonotic hookworms in dogs from four counties of Kenya[J]. *J Helminthol*, 2019, 94: e43.
- [10] SMOUT F A, SKERRATT L F, BUTLER J R A, et al. The hookworm *Ancylostoma ceylanicum*: an emerging public health risk in Australian tropical rainforests and indigenous communities[J]. *One Health*, 2017, 3: 66-69.
- [11] 陈颖丹, 周长海, 朱慧慧, 等. 2015 年全国人体重点寄生虫病现状调查分析[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2020, 38(1): 5-16.
CHEN Y D, ZHOU C H, ZHU H H, et al. National survey on the current status of important human parasitic diseases in China in 2015 [J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2020, 38(1): 5-16.(in Chinese)
- [12] 朱慧慧, 黄继磊, 陈颖丹, 等. 2019 年全国土源性线虫感染状况分析[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2021, 39(5): 666-673.
ZHU H H, HUANG J L, CHEN Y D, et al. Analysis on endemic status of soil-transmitted nematode infection in China in 2019[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2021, 39(5): 666-673.(in Chinese)
- [13] 刘远佳, 李国清, 郑国超, 等. 广州市犬猫锡兰钩虫人畜共患风险评估. 郑州: 2013: 139-142.
- [14] 国家卫生和计划生育委员会. 钩虫病的诊断: WS 439—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [15] 诸廷俊, 周长海, 许隆祺, 等.《肠道蠕虫检测改良加藤厚涂片法》(WS/T 570-2017)解读[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2018, 30(5): 575-577.
ZHU T J, ZHOU C H, XU L Q, et al. Interpretation of detection of intestinal helminthes—the kato-katz method (WS/T 570-2017) [J]. *Chin J Schistosomiasis Control*, 2018, 30(5): 575-577.(in Chinese)
- [16] BOSCH F, PALMEIRIM M S, ALI S M, et al. Diagnosis of soil-transmitted helminths using the Kato-Katz technique: what is the influence of stirring, storage time and storage temperature on stool sample egg counts?[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2021, 15(1): e0009032.
- [17] STOREY H L, AGARWAL N, CANTERA J, et al. Formative research to inform development of a new diagnostic for soil-transmitted helminths: going beyond the laboratory to ensure access to a needed product[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019, 13(5): e0007372.
- [18] 周莉, 金伟, 郭见多, 等. 改良加藤厚涂片法检查土源性线虫卵的检出效果[J]. *热带病与寄生虫学*, 2014, 12(2): 89-91.

- ZHOU L, JIN W, GUO J D, et al. The detective effect on the eggs of soil-transmitted nematodes by Kato-Katz technique in the single smear[J]. J Trop Dis Parasitol, 2014, 12(2): 89-91.(in Chinese)
- [19] 季虹, 刘晓明, 王勇, 等. 饱和盐水漂浮法中玻片不同放取时间下钩虫卵检出率的比较[J]. 热带病与寄生虫学, 1999(1): 54.
- JI H, LIU X M, WANG Y, et al. Comparison of detection rate of hookworm eggs in different time of glass slides in saturated brine flotation method[J]. J Trop Dis Parasitol, 1999(1): 54.(in Chinese)
- [20] 刘晓明, 季虹, 尹晓梅. 玻片处理对漂浮法检出钩虫卵效果的影响[J]. 热带病与寄生虫学, 2000(2): 106.
- LIU X M, JI H, YIN X M. Effect of slide treatment on the detection of hookworm eggs by floating method[J]. J Trop Dis Parasitol, 2000(2): 106.(in Chinese)
- [21] 刘晓明, 季虹, 尹晓梅, 等. 青霉素瓶定量饱和盐水漂浮法与 Kato-Katz 法检查钩虫卵的比较研究[J]. 热带病与寄生虫学, 2001(1): 33-34, 8.
- LIU X M, JI H, YIN X M, et al. Comparative studies on examining hookworm eggs between quantitative saturated salt flotation method with peniciline bottle and kato-katz technique[J]. J Trop Dis Parasitol, 2001(1): 33-34, 8.(in Chinese)
- [22] 吴中兴, 钱益新. 两种人体钩虫感染性幼虫的形态鉴别[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2018, 30(3): 359-360.
- WU Z X, QIAN Y X. Differentiating the morphology of infective larvae between two human hookworms[J]. Chin J Schistosomiasis Control, 2018, 30(3): 359-360.(in Chinese)
- [23] 韦华, 杨玉荣. 宠物犬犬钩虫的调查及生活史各期形态观察[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(8): 789-791.
- WEI H, YANG Y R. Study on *Ancylostoma caninum* in dogs and the observation of different stages of life cycle[J]. Chin J Zoonoses, 2006, 22(8): 789-791.(in Chinese)
- [24] HAAS W, HABERL B, SYAFRUDDIN, et al. Infective larvae of the human hookworms *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale* differ in their orientation behaviour when crawling on surfaces[J]. Parasitol Res, 2005, 95(1): 25-29.
- [25] CHERGUI H, AKHOUNDI M, MARTEAU A, et al. Severe iron-deficiency anaemia due to hookworm infection diagnosed by capsule endoscopy[J]. Int J Infect Dis, 2021, 104: 271-272.
- [26] COTON T, MASSOURE M P, COTTEZ S, et al. Human hookworm disease: Enteroscopy and video capsule endoscopy features[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2018, 42(3): e39-e40.
- [27] GAN T, YANG Y L, LIU S C, et al. Automatic detection of small intestinal hookworms in capsule endoscopy images based on a convolutional neural network[J]. Gastroenterol Res Pract, 2021, 2021: 5682288.
- [28] HE J Y, WU X, JIANG Y G, et al. Hookworm detection in wireless capsule endoscopy images with deep learning[J]. IEEE Trans Image Process, 2018, 27(5): 2379-2392.
- [29] SANYA R E, NKURUNGI G, ANDIA BIRARO I, et al. A life without worms[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2017, 111(1): 3-11.
- [30] 吴小珉, 戴洋, 曹俊. 钩虫感染诱导宿主免疫反应及其潜在治疗价值研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2019, 31(5): 560-564.
- WU X M, DAI Y, CAO J. Progress of research on host immune responses induced by hookworm infection and its potential therapeutic values[J]. Chin J Schistosomiasis Control, 2019, 31(5): 560-564.(in Chinese)
- [31] AYDIN S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA[J]. Peptides, 2015, 72: 4-15.
- [32] SOUZA D C, DE FARIA L S, SOUSA J E N, et al. Use of polyclonal IgY antibodies to detect serum immune complexes in patients with active hookworm infection[J]. Parasitology, 2020, 147(6): 715-720.
- [33] 杨益, 杨玥涛, 石锋, 等. 美洲钩虫病患者血清优势抗体的检测分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2016, 34(1): 40-43.
- YANG Y, YANG Y T, SHI F, et al. Analysis of antibodies with superior antigen-recognition in serum from patients infected by *Necator americanus*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2016, 34(1): 40-43.(in Chinese)
- [34] 陈家旭, 常正山. ELISA 检测粪抗原诊断寄生虫感染的研究进展[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2006(6): 296-300.
- CHEN J X, CHANG Z S. The progress of study on diagnosis for intestinal parasitic infection by coproantigen detection[J]. Int J Med Parasit Dis, 2006(6): 296-300.(in Chinese)
- [35] BALINSKY D L, PARAS K L, HANNA R T, et al. Parasite survey on a captive wolf population using classical techniques and ELISA coproantigen detection, USA[J]. Vet Parasitol Reg Stud Rep, 2019, 16: 100285.
- [36] ADOLPH C, BARNETT S, BEALL M, et al. Diagnostic strategies to reveal covert infections with intestinal helminths in dogs[J]. Vet Parasitol, 2017, 247: 108-112.
- [37] LITTLE S E, BARRETT A W, BEALL M J, et al. Coproantigen detection augments diagnosis of common nematode infections in dogs[J]. Top Companion Animal Med, 2019, 35: 42-46.
- [38] 周梦婕, 李小盼, 代荣阳, 等. 免疫层析试纸条检测技术的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(22): 3382-3386.
- ZHOU M J, LI X P, DAI R Y, et al. Research progress of immunochromatographic test strip detection technology[J]. Lab Med Clin, 2019, 16(22): 3382-3386.(in Chinese)
- [39] 石锋, 杨益, 汪俊云, 等. 快速检测美洲钩虫特异抗体胶体金免疫层析试纸条方法的建立与效果评价[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2018, 36(2): 119-123.
- SHI F, YANG Y, WANG J Y, et al. Establishment and evaluation of colloid gold-labeled immunochromatographic test strip for rapid detection of antibody against *Necator americanus*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2018, 36(2): 119-123.(in Chinese)
- [40] VLAMINCK J, LAGATIE O, DANA D, et al. Identification of antigenic linear peptides in the soil-transmitted helminth and *Schistosoma mansoni* proteome[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2021, 15(4): e0009369.
- [41] 郑琪, 沈海默, 陈家旭, 等. 中国两种钩虫成虫的 PCR 虫种鉴定研究[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2012, 39(2): 94-97.
- ZHENG Q, SHEN H M, CHEN J X, et al. PCR identification of two hookworm species in China[J]. Int J Med Parasit Dis, 2012, 39(2): 94-97.(in Chinese)
- [42] CHANG T, JUNG B K, SOHN W M, et al. Morphological and molecular diagnosis of *Necator americanus* and *Ancylostoma ceylanicum* recovered from villagers in northern Cambodia[J]. Korean J Parasitol

- tol, 2020, 58(6): 619–625.
- [43] 刘远佳, 郑国超, 刘田, 等. 猫锡兰钩虫 rDNA ITS1 的扩增及分子鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(10): 821–824.
LIU Y J, ZHENG G C, LIU T, et al. Isolation and identification of feline hookworm based on ribosomal ITS1 sequence analysis[J]. Chin J Prev Vet Med, 2013, 35(10): 821–824.(in Chinese)
- [44] AUNG W P P, HTOON T T, TIN H H, et al. First molecular identifications of *Necator americanus* and *Ancylostoma ceylanicum* infecting rural communities in lower Myanmar[J]. Am J Trop Med Hyg, 2017, 96(1): 214–216.
- [45] BEZERRA-SANTOS M A, FURTADO L F V, RABELO É M L, et al. High prevalence of *Ancylostoma caninum* infection in black-eared opossums (*Didelphis aurita*) in an urban environment[J]. Parasitol Res, 2020, 119(7): 2343–2346.
- [46] FURTADO L F V, DIAS L T O, RODRIGUES T O, et al. Egg genotyping reveals the possibility of patent *Ancylostoma caninum* infection in human intestine[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 3006.
- [47] JUNG B K, LEE J Y, CHANG T, et al. Rare case of enteric *Ancylostoma caninum* hookworm infection, south Korea[J]. Emerg Infect Dis, 2020, 26(1): 181–183.
- [48] GEORGE S, LEVECKE B, KATTULA D, et al. Molecular identification of hookworm isolates in humans, dogs and soil in a tribal area in Tamil Nadu, India[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2016, 10(8): e0004891.
- [49] 汪家旭, 黄建伟, 叶曦, 等. SYBR Green 荧光 PCR 检测美洲钩虫方法的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(12): 1110–1113.
WANG J X, HUANG J W, YE X, et al. Developing SYBR green fluorescent quantitative PCR for detecting *Necator americanus*[J]. Chin J Zoonoses, 2010, 26(12): 1110–1113.(in Chinese)
- [50] MASSETTI L, COLELLA V, ZENDEJAS P A, et al. High-throughput multiplex qPCRs for the surveillance of zoonotic species of canine hookworms[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2020, 14(6): e0008392.
- [51] 袁芳, 徐进, 季林丹, 等. Tm-shift 基因分型方法在遗传学中的应用[J]. 遗传, 2012, 34(11): 1500–1506.
YUAN F, XU J, JI L D, et al. Application of Tm-shift genotyping method in genetic studies[J]. Hereditas, 2012, 34(11): 1500–1506.(in Chinese)
- [52] FU Y Q, WANG M W, YAN X X, et al. T_m-shift detection of dog-derived *Ancylostoma ceylanicum* and *A. caninum*[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 7617094.
- [53] 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.
LI T, YANG K. Application of isothermal amplification technology for pathogen detection in parasitic and other diseases[J]. Chin J Schistosomiasis Control, 2018, 30(2): 232–236.(in Chinese)
- [54] 张曼, 刘宝林, 高志贤. 环介导等温扩增技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(18): 6124–6130.
ZHANG M, LIU B L, GAO Z X. Research progress of loop-mediated isothermal amplification technology[J]. J Food Saf & Qual, 2019, 10(18): 6124–6130.(in Chinese)
- [55] 危芙蓉, 朱慧慧, 贾孝凯, 等. 环介导等温扩增法检测人粪样中美洲钩虫的方法建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(7): 530–533.
WEI F R, ZHU H H, JIA X K, et al. Establishment of LAMP assay for the detection of *Necator Americanus* in fecal samples[J]. Chin J Zoonoses, 2020, 36(7): 530–533.(in Chinese)
- [56] MUGAMBI R M, AGOLA E L, MWANGI I N, et al. Development and evaluation of a Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique for the detection of hookworm (*Necator americanus*) infection in fecal samples[J]. Parasit Vectors, 2015, 8: 574.
- [57] PAPAIAKOVU M, LITTLEWOOD D T J, GASSER R B, et al. How qPCR complements the WHO roadmap (2021–2030) for soil-transmitted helminths[J]. Trends Parasitol, 2021, 37(8): 698–708.
- [58] STRACKE K, CLARKE N, AWBURN C V, et al. Development and validation of a multiplexed-tandem qPCR tool for diagnostics of human soil-transmitted helminth infections[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2019, 13(6): e0007363.
- [59] AZZOPARDI K I, HARDY M, BAKER C, et al. Detection of six soil-transmitted helminths in human stool by qPCR – a systematic workflow[J]. PLoS One, 2021, 16(9): e0258039.
- [60] MOMČILOVIĆ S, CANTACESSI C, ARSIĆ – ARSENIJEVIĆ V, et al. Rapid diagnosis of parasitic diseases: current scenario and future needs[J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(3): 290–309.

收稿日期:2022-09-13 编辑:王佳燕