

环境 DNA 技术在血吸虫病监测中的应用研究进展

周己烜, 侯嘉然, 赵倩倩, 姚佳一, 何兴, 唐睿*

中国人民解放军海军军医大学热带病学教研室, 上海 200433

摘要: 血吸虫病是一种重要的人兽共患寄生虫病, 是 WHO 确定的六大热带病之一, 也是我国重点防控的寄生虫病之一。经过七十多年的努力, 我国血吸虫病防控工作取得了巨大成就, 当前我国血吸虫病疫情已进入极低度流行状态, 但血吸虫唯一中间宿主钉螺的分布面积基数仍然较大, 目前血吸虫病的监测技术存在费时费力、敏感性低等缺点, 不能满足我国的现状需求。环境 DNA(environmental DNA, eDNA)是指无需分离任何目标生物即可从环境样本(如土壤、水或空气)中提取的 DNA, 是来自同一环境中不同生物体基因组 DNA 及其降解产物所组成的复杂混合物。eDNA 技术可以通过对环境样品进行 DNA 提取和检测, 反映生态系统中的群落或物种组成信息。相较于传统生物监测方法, eDNA 技术具有高效率、高灵敏度、环境友好等优势。eDNA 技术目前已成功应用于曼氏血吸虫病、埃及血吸虫病和日本血吸虫病的监测。本文对目前 eDNA 的检测方法、eDNA 技术在血吸虫病监测中的应用及其技术局限性进行了综述, 旨在为血吸虫病监测领域的研究提供科学参考。

关键词: 血吸虫; 环境 DNA; 生态监测; 检测技术

中图分类号: R532.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2022)11-1092-05

DOI: 10.13604/j.cnki.46-1064/r.2022.11.18

Advances of environmental DNA technology in schistosomiasis surveillance

ZHOU Ji-xuan, HOU Jia-ran, ZHAO Qian-qian, YAO Jia-yi, HE Xing, TANG Rui

Department of Tropical Infectious Diseases, Naval Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: TANG Rui, E-mail: buzztr@163.com

Abstract: Schistosomiasis, an important zoonotic parasitic disease, is one of the six major tropical diseases identified by WHO, and also one of the most important parasitic diseases for prevention and control in China. After more than 70 years of efforts, the prevention and control of schistosomiasis in China has made great achievements, and the current epidemic of schistosomiasis in China has entered an extremely low epidemic state, but the distribution base of the only intermediate host of schistosomiasis, *Oncomelania hupensis*, is still large. For now, the techniques used to monitor schistosomiasis have shortcomings such as time-consuming, laborious and low sensitivity, which cannot meet the current needs of China. Environmental DNA (eDNA) refers to DNA that can be extracted from environmental samples (such as soil, water or air) without isolating any target organisms, which is a complex mixture of genomic DNA and its degradation products from different organisms in the same environment. eDNA technology can reflect the community or species composition information in the ecosystem through DNA extraction and detection of environmental samples. Compared with traditional biological monitoring methods, eDNA technology has the advantages of high efficiency, high sensitivity and environmental friendliness. eDNA has been successfully used for the specific detection of *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma japonicum*. This paper reviews the current detection methods of eDNA, the application and technical limitations of eDNA technology in schistosomiasis monitoring, aiming to provide scientific reference for research in the field of schistosomiasis surveillance.

Keywords: *Schistosoma*; environmental DNA; ecological monitoring; detecting technique

血吸虫病是一种严重但被忽视的热带传染病, 全球感染人数超过 2.5 亿, 重症患者超过 2 000 万, 每年约有 20 万人死于血吸虫病^[1]。感染人类的血吸虫主要有 6 种, 即日本血吸虫、曼氏血吸虫、埃及血吸虫、间插血吸虫、湄公血吸虫和马来血吸虫, 我国仅有日本血吸虫流行。血吸虫成虫寄生于人类或哺乳动物

门脉-肠系膜静脉内, 引起人畜共患的血吸虫病。新中国成立 70 年来, 我国的血吸虫病防治工作取得了辉煌的成就。截至 2020 年底, 全国原有的 12 个血吸虫病流行省(直辖市)中, 上海、浙江、福建、广东、广西等 5 个省(直辖市)已实现血吸虫病消除的目标, 四川、江苏省已达到传播阻断标准, 云南、湖北、安徽、江

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No.81871678); 海军军医大学海军医学系“海狼”军事医学(核生化防护)学员创新实践课题(No.HL21JD1222); 海军军医大学校级基础医学研究课题(No.2021QN09)

作者简介: 周己烜(2001—), 女, 本科在读, 研究方向: 热带病学。

***通信作者:** 唐睿, E-mail: buzztr@163.com

西、湖南等 5 个省已实现传播控制标准^[2]。当前我国血吸虫病疫情已进入极低度流行状态,但我国钉螺孳生环境及分布面积并未发生明显变化,尤其在湖沼型流行区,钉螺面积的基数仍然较大,钉螺复现和新发现状况不断出现。所以要实现从“传播阻断”走向“消除”,血吸虫病监测工作尤为重要^[3]。

近年来,环境 DNA(environmental DNA, eDNA)技术发展迅速,该技术已被广泛应用于生物监测、群落研究和生态保护等领域^[4]。由于目前寄生虫的鉴别和分布定位仍面临诸多挑战,因此该技术尤其适用于对于寄生虫的检测和研究。本文从我国现有血吸虫病监测手段、eDNA 的研究方法和 eDNA 在血吸虫病监测中的应用等方面,全面阐述了 eDNA 在血吸虫病监测中的应用研究进展。

1 我国现有血吸虫病监测技术

1.1 中间宿主钉螺的监测

1.1.1 常规钉螺调查 钉螺是日本血吸虫的唯一中间宿主,常规钉螺调查一般是在每年 3—5 月和 9—10 月,参考钉螺的分布史,在有螺或疑似有螺的环境中,采用系统抽样的方式调查螺情,同时也可以结合地理定位系统在空间上对于钉螺的分布进行定位。每年 6—9 月,可采取网捞法定量调查水网地区河道漂浮物携螺情况,以及通过稻草帘诱螺的方法调查钉螺输入情况^[5]。常规钉螺调查需要耗费大量的人力和时间,经常发生漏检的现象,准确度难以保证,且难以及时地反映环境改变对螺情的影响,同时在调查过程中存在人员感染的风险。

1.1.2 3S 技术 钉螺环境监测及数据分析中的应用“3S”技术是遥感技术(remote sensing, RS)、地理信息系统(geographical information system, GIS)、全球定位系统(global positioning system, GPS)的统称。使用 RS 绘制的螺类孳生地分布图比地面调查具有精准、成本低、包含信息丰富、可重复观察等诸多优点^[6]。GIS 可叠加多层数据,适用于建立螺情的空间数据库,将钉螺分布和疫情发展可视化,实现对图形信息的处理和分析,并建立生态模型^[7]。GPS 可以在螺情调查中记录地理坐标,为螺情监测及分析提供便利^[8]。受成本和分辨率的制约,遥感影像在环境因素复杂的区域难以识别,通过遥感影像研究多采用主观的监督分类。

1.2 血吸虫病病原体的监测

1.2.1 哨鼠监测技术 该技术是在监测水体现场放置哨鼠,并使哨鼠与水体充分接触 5 h,持续 2 d。将存活的小鼠带回实验室继续饲养 35 d,让可能感染的尾蚴在小鼠体内发育为成虫,解剖小鼠并计数成虫数量,从而评估监测水体中血吸虫的含量及对人类的感染风险^[9]。该方法需要耗费大量人力,在时间和资源

方面代价高昂,定期或全面的监测在后勤上难以实现,并且可能引发动物伦理问题。

1.2.2 从粪便中检查虫卵或毛蚴 该方法通过检测野外粪便中的虫卵,评估日本血吸虫在社区内的流行性。监测范围为牛、羊、猪、马、狗等家畜或人群经常活动的野外环境。检测方法有改良加藤厚涂片法、直接涂片法、尼龙袋集卵法、毛蚴孵化法、定量透明法等^[10]。

1.2.3 尾蚴测定法 该方法是从监测地区取水样并过滤,收集并通过显微镜计数尾蚴,推断出尾蚴的密度和对人类的传播风险^[11]。这些数据可以利用元数据如流体动力条件、与季节性相关的时间变化等进行分析,并结合对钉螺尾蚴排放峰值的已知数据,估计尾蚴密度^[12]。尾蚴计数通常使用显微镜,根据镜下形态特征对尾蚴进行鉴定分类^[13]。由于人类和非人类血吸虫通常流行区重叠,因此需要有经验的技术人员对尾蚴进行分类。

1.2.4 阳性钉螺调查方法 该方法是在监测水体中定时、定向取样,对水样中的钉螺通过尾蚴溢出、粉碎或分子生物学等方法进行处理,以确定它们是否被日本血吸虫毛蚴感染^[14]。

1.2.5 分子生物学方法 该类方法是对血吸虫的核酸进行检测,具有高灵敏度、高时效性和高特异性。目前应用于血吸虫病监测的分子生物学方法包括聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)^[15-16]、环介导的恒温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification of DNA, LAMP)^[17-18]、重组聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)^[19-20]、指数富集的配基系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)^[21]及微流控盒技术(microfluidic cassette)^[22]等。目前分子生物学检测已经成为了诊断早期血吸虫病的潜在方法。

1.3 易感因素监测

1.3.1 人群感染情况监测 每年 10—11 月份,对监测点常住居民和高危流动人口开展日本血吸虫病血清学筛查^[23],筛查阳性者采用尼龙绢袋集卵孵化法和改良加藤厚涂片法开展病原学平行检查^[24]。

1.3.2 家畜感染情况监测 每年 10—11 月份,采用塑料杯顶管孵化法检测监测点的家畜(牛、羊、猪、马、狗等)日本血吸虫感染情况^[25]。

2 eDNA 的概念及检测方法

2.1 eDNA 的概念 eDNA 是指与环境相互作用的生物体留下或释放的 DNA,是来自同一环境中不同生物体基因组 DNA 及其降解产物的复杂混合物^[26]。在血吸虫病的背景下,这种 eDNA 可以直接从中间宿主生物(受感染的螺类)、受感染生物的样本(人类粪便)

和环境基质(土壤和水)中提取^[27]。

2.2 eDNA 的检测方法 eDNA 检测技术是指利用各种检测手段识别 eDNA 中关于目标物种的信息,监测已知生物在环境中的分布情况,探寻环境中的未知生物^[28]。

2.2.1 PCR 技术 聚合酶链式反应(PCR)是一种在体外放大扩增特定 DNA 片段的分子生物学技术,最基础的方法是普通 PCR 扩增和定量 PCR(qPCR)^[29-30]。基于 eDNA 进行物种检测的核心是从复杂混合物中扩增特定的 DNA 序列,普通 PCR 或 qPCR 均能揭示环境样品中目标 DNA 的存在。但是,普通 PCR 只能测量目标 DNA 的最终浓度,最终浓度不一定与反应的原始浓度成正比,而 qPCR 则能进行定量分析。因此,出于生物监测目的,采用 qPCR 可提供采样环境中目标物种的丰度信息^[26]。

2.2.2 NGS 技术 第二代测序(next-generation sequencing, NGS)是目前最新的高通量测序技术。其技术的核心是边合成边测序,通过捕捉新合成的末端标记来确定 DNA 的序列。与传统 Sanger 测序相比较,NGS 在很多技术上都有了突破,包括文库的构建、锚定桥接、预扩展等,使上百万的测序反应同时发生在一个反应里,既降低测序成本,也缩短测序时间^[31]。尽管读取准确度及读取片段的长度都不及 Sanger 测序,但这些不足可通过测序的覆盖率和生物信息学的方法来克服,在很短时间内完成对上百亿碱基的测序,可实现极短时间内对 eDNA 序列进行细致的研究。

2.2.3 DNA 宏条形码技术 DNA 条形码的主要作用是用于物种水平的鉴别,通过所得的 DNA 序列与标准条形码(standard barcoding)比对,就可以知道目标生物的种类。基于此,研究人员构建了专门的 DNA 条形码数据库(international barcode of life),10 年来超过 10 万个物种的 DNA 条形码数据的信息存储其中。但随着 eDNA 的应用不断发展,传统的 DNA 条形码已经不能满足人们在 eDNA 应用中的需求。所以,Xu 等^[32]在 2011 年提出了一种新型 DNA 条形码,即 DNA 宏条形码(DNA metabarcoding)。其作用并不是用于鉴别单一、少许的样本,而是用于多重分类单元的分类鉴定。通过合理的通用引物设计和宏 DNA 条形码选择可以做到对环境群落物种进行准确的分类鉴定。

3 eDNA 在血吸虫监测中的应用

在过去的十年中,eDNA 已成功地应用于曼氏血吸虫、埃及血吸虫和日本血吸虫的特异性检测。研究者们从流行环境中已知的传播地点取样,将产生的数据与传统流行病学调查的数据进行比较。在这些研究中,采集的水体样本经过滤后,用 70% 的乙醇或 RNA later 来固定样本以保存 eDNA,之后进一步提取

DNA 用于 PCR 反应和鉴定。

SATOM 等^[33]从 NCBI 上获得了 22 种吸虫的线粒体基因细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase I, COX1)的序列,从而设计了针对曼氏血吸虫 COX1 的种属特异性引物,并利用曼氏血吸虫、日本血吸虫和湄公血吸虫的成虫 DNA 验证了引物的特异性。作者在马达加斯加的 7 个地点采集了水体 eDNA 样本,qPCR 检测发现了一处水体的样本存在血吸虫 COX1 基因阳性,该水体是一条位于社区后方的小河,居民在这里洗刷餐具和衣物以及休闲。通过对于 17 名居民的调查,居民们的描述均与血吸虫病史相符,超声波检查结果均为典型的慢性血吸虫感染病变。螺体调查也在该水体中发现了中间宿主浦氏双脐螺。

FORNILLOS 等^[34]针对日本血吸虫和其宿主钉螺的线粒体基因 COX1 分别设计了一对引物,通过 qPCR 技术结合 Taqman 探针用于检测环境中日本血吸虫和钉螺的 DNA。他们检测了菲律宾地区的日本血吸虫和钉螺阳性水域,其中通过钉螺调查法发现的 5 个日本血吸虫阳性水域中,4 个水域的 eDNA 检测出了日本血吸虫阳性,eDNA 检测方法与钉螺调查结果一致率达到 80%;在 7 个钉螺阳性水域中,6 个水域的 eDNA 检测出钉螺阳性,一致率达到 85.7%。另外,研究者在 12 个钉螺调查法阴性的水域中,通过 eDNA 检测出了 3 个阳性水域,研究者认为导致该结果的可能原因是,水体中的 eDNA 具有流动性,可能来源于与其相接的上流水域,这点在血吸虫病防控中非常重要,特别是在预测尾蚴可能被携带或运输到其他区域,从而感染不知情宿主的空间范围方面。

SENGUPTA 等^[35]针对曼氏血吸虫线粒体基因 COX1 设计了特异性 qPCR 引物,在实验室实验中,qPCR 通过 eDNA 检测曼氏血吸虫尾蚴的灵敏度能够达到每升水中仅需 10 只尾蚴。在现场实验中,研究者检测了肯尼亚地区螺体调查阳性的水域,eDNA 检测与螺体调查的阳性一致率能够达到 71%,同时,研究者报道,高样本量(7 个水域样本)的检测中,eDNA 检测方法所需的人力资源投入相较于传统螺类调查法减少了一半。EYRE 等^[36]在柯麦隆采集了 7 个水体的 eDNA 用以检测埃及血吸虫,通过 qPCR 检测,其中 4 个样本结果呈现阳性。ALZAYLAEE 等^[37]针对曼氏血吸虫、埃及血吸虫和日本血吸虫的线粒体 16S rRNA 基因设计了特异性的引物用于 eDNA 检测。为验证引物的特异性,研究者合成多种血吸虫的 DNA 序列,这些引物总体的特异性较高,但是日本血吸虫和埃及血吸虫的引物与近缘血吸虫的 DNA 产生了非特异性扩增。之后研究者在坦桑尼亚的 8 个离散的天然淡水水域验证了曼氏血吸虫和埃及血吸虫引物的检测

效果,检测结果与传统的螺体调查结果高度一致。另外 ALZAYLAEE 等^[38]还在实验室研究中发现,水体中血吸虫 eDNA 的丰度与阳性螺体的数量和螺类感染程度呈正相关。

4 eDNA 技术在血吸虫病监测中的不足

与传统监测方法相比,eDNA 有其高灵敏度、非入侵性等优势,但也存在着一些明显的不足。首先,难以确定自然水体中 eDNA 丰度与其来源生物数量间关系。由于水体环境中各种生物和非生物因素影响,水体中 eDNA 的降解速率很难预计,对研究 eDNA 丰度和其来源生物数量间的相关性带来困难^[14]。然而,该项信息对于血吸虫病监测和评估水域感染风险至关重要;尽管其他研究领域在该方向已取得部分进展^[39],但目前在血吸虫监测领域中仍缺乏相关研究结果。其次,eDNA 技术不能区分血吸虫各个虫期及生命状态。血吸虫在水体中具有不同多个生活史阶段,而 eDNA 技术的检测引物是根据 DNA 设计的,因此无法分辨环境中的 DNA 是来源于血吸虫的哪个生活史阶段,也无法鉴别 eDNA 来源生物的死活^[14]。但是,这些缺陷并不影响对于水体血吸虫的监测,因检测到毛蚴也意味着寄生虫存在并可能通过宿主完成其生命周期。在实验室环境中,水中血吸虫 eDNA 一周即会降解^[35],在自然环境中,eDNA 的降解速度可能更快,因此只要检测到血吸虫 eDNA 的存在,就能代表正在进行的潜在传播。最后,如何从浑浊的水域中获得 eDNA 也是一个难题。为了获得 eDNA 需要用较小孔径的滤器,然而浑浊水体会导致滤器堵塞^[38]。因此,往往需要先用大孔径的滤器过滤水中的大块杂质,再用小孔径滤器获得 eDNA,但这会增加时间成本,因此水体的过滤方法和 eDNA 的提取方法仍有待改进。

5 总 结

在血吸虫病监测中,传统的监测手段因需要耗费大量的人力资源和时间成本,同时难度大、经济成本高,因此很难实现对于血吸虫流行区域的大范围精准监测。eDNA 技术是分子生物学发展的重要进展,通过 eDNA 技术对水生环境进行采样,量化血吸虫的传播风险,可以为血吸虫病监测防治提供宝贵信息。虽然目前存在着数据库不完善、监测流程还需进一步规范等问题,但其具有高灵敏度、省时省力、环境友好等优点,有潜力成为监测血吸虫病的一项关键工具。将 eDNA 技术和传统监测手段相结合,有可能实现更大范围、更高效率的血吸虫病监测。

利益冲突声明 所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

[1] MCMANUSD P, DUNNED W, SACKO M, et al. Schistosomiasis[J].

Nat Rev Dis Primers, 2018, 4(1): 13

[2] ZHANG L J, XU Z M, GUO J Y, et al. Endemic status of schistosomiasis in People's republic of China in 2018[J]. Chin J Schistosomiasis Control, 2019, 31(6): 576-582.(in Chinese)

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.

[3] XU J, LÜ S, CAO C L, et al. Progress and challenges of schistosomiasis elimination in China[J]. Chin J Schistosomiasis Control, 2018, 30(6): 605-609.(in Chinese)

许静, 吕山, 曹淳力, 等. 我国血吸虫病消除工作进展及面临的挑战[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2018, 30(6): 605-609.

[4] COULTER D P, WANG P, COULTER A, et al. Nonlinear relationship between Silver Carp density and their eDNA concentration in a large river[J]. PLoS One, 2019, 14(6): e0218823.

[5] SUN D K, LI Q, WANG Q F. Study on surveillance and forecast scheme of schistosomiasis in upper section of Huaihe River outfall water way[J]. China Trop Med, 2017, 17(5): 477-479, 484.(in Chinese)

孙道宽, 李倩, 王全锋. 淮河入江水道上段血吸虫病监测预警方案研究[J]. 中国热带医学, 2017, 17(5): 477-479, 484.

[6] HAYES R O, MAXWELL L, MITCHELL J, et al. Detection, identification, and classification of mosquito larval habitats using remote sensing scanners in earth-orbiting satellites[J]. Bull World Health Organ, 1985, 63(2): 361-374.

[7] ZHENG Y J, ZHONG J H, LIU Z D, et al. The application of geographical information system for analysis of snail distribution[J]. Chin J Schistosomiasis Control, 1998, 10(2): 69-72.(in Chinese)

郑英杰, 钟久河, 刘志德, 等. 应用地理信息系统分析洲滩钉螺的分布[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1998, 10(2): 69-72.

[8] MANYANGADZE T, CHIMBARIM J, GEBRESLASIE M, et al. Application of geo-spatial technology in schistosomiasis modelling in Africa: a review[J]. Geospat Health, 2015, 10(2): 326..

[9] SPEARR C, ZHONG B, MAO Y, et al. Spatial and temporal variability in schistosome cercarial density detected by mouse bioassays in village irrigation ditches in Sichuan, China[J]. Am J Trop Med Hyg, 2004, 71(5): 554-557.

[10] SONG L G, WU Z D. Progress of researches on the diagnostic techniques for schistosomiasis[J]. Chin J Schistosomiasis Control, 2021, 33(6): 660-663.(in Chinese)

宋兰桂, 吴忠道. 血吸虫病诊断技术研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2021, 33(6): 660-663.

[11] AOKI Y, SATO K, MUHOHON D, et al. Cercariometry for detection of transmission sites for schistosomiasis[J]. Parasitol Int, 2003, 52(4): 403-408.

[12] THÉRON A. Cercariometry and the epidemiology of schistosomiasis [J]. Parasitol Today, 1986, 2(3): 61-63.

[13] FRANDSEN F, CHRISTENSEN O. An introductory guide to the identification of cercariae from African freshwater snails with special reference to cercariae of trematode species of medical and veterinary importance[J]. Acta Trop, 1984, 41(2): 181-202.

[14] KAMEL B, LAIDEMITTM R, LU L J, et al. Detecting and identifying *Schistosoma* infections in snails and aquatic habitats: a systematic review[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2021, 15(3): e0009175.

[15] PONTESL A, DIAS-NETO E, RABELLO A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum

- and feces[J]. Am J Trop Med Hyg, 2002, 66(2): 157–162.
- [16] KUMAGAI T, FURUSHIMA-SHIMOAWARA R, OHMAE H, et al. Detection of early and single infections of *Schistosoma japonicum* in the intermediate host snail, *Oncomelania hupensis*, by PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay[J]. Am J Trop Med Hyg, 2010, 83(3): 542–548.
- [17] HAMBURGER J, ABBASI I, KARIUKI C, et al. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification suitable for molecular monitoring of schistosome-infected snails in field laboratories[J]. Am J Trop Med Hyg, 2013, 88(2): 344–351.
- [18] XU J, RONG R, ZHANGH Q, et al. Sensitive and rapid detection of *Schistosoma japonicum* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Int J Parasitol, 2010, 40(3): 327–331.
- [19] ZHENG W B, WU Y D, MA J G, et al. Recombinase polymerase amplification and its applications in parasite detection[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2015, 33(5): 382–386.(in Chinese)
郑文斌, 吴耀东, 马剑钢, 等. 重组酶聚合酶扩增技术及其在寄生虫检测中的应用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2015, 33(5): 382–386.
- [20] FAN X X, ZHAO Y G, LI L, et al. Research progress of recombinant enzyme polymerase amplification(RPA) in rapid detection of diseases [J]. China Animal Heal Insp, 2016, 33(8): 72–77.(in Chinese)
樊晓旭, 赵永刚, 李林, 等. 重组酶聚合酶扩增技术在疾病快速检测中的研究进展[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(8): 72–77.
- [21] ABATHF G C, GOMESA L D V, MELOF L, et al. Molecular approaches for the detection of *Schistosoma mansoni*: possible applications in the detection of snail infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2006, 101(Suppl 1): 145–148.
- [22] SONG J Z, LIU C C, BAIS S, et al. Molecular detection of schistosome infections with a disposable microfluidic cassette[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(12): e0004318.
- [23] GUAN Z, LÜ S, LI S Z, et al. Analysis on the situation of schistosome infections in floating population in national schistosomiasis surveillance sites of China[J]. Chin J Schistosomiasis Control, 2018, 30(2): 124–130.(in Chinese)
关周, 吕山, 李石柱, 等. 全国血吸虫病监测点流动人口血吸虫感染情况分析[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2018, 30(2): 124–130.
- [24] CHEN Y, ZHANG R, GAO L, et al. Surveillance of schistosomiasis in Wuhu, Anhui, 2015–2019[J]. China Trop Med, 2022, 22(2): 112–117.(in Chinese)
陈勇, 张戎, 高岚, 等. 安徽省芜湖市 2015—2019 年血吸虫病疫情监测[J]. 中国热带医学, 2022, 22(2): 112–117.
- [25] HUANG L Z, LYU L F, HUANG X M, et al. Epidemic surveillance in national schistosomiasis surveillance sites in Liyang, Jiangsu, 2015–2019[J]. China Trop Med, 2020, 20(7): 634–636.(in Chinese)
黄立中, 吕来福, 黄小妹, 等. 江苏省溧阳市 2015—2019 年国家血吸虫病监测点疫情监测[J]. 中国热带医学, 2020, 20(7): 634–636.
- [26] ZHANG N, XIE Y H, LI J Q, et al. Research progress on the application of environmental DNA[J]. China Animal Heal Insp, 2020, 37(11): 68–75.(in Chinese)
张娜, 谢艳辉, 李家桥, 等. 环境 DNA 应用研究进展[J]. 中国动物检疫, 2020, 37(11): 68–75.
- [27] BASS D, STENTIFORD D, LITTLEWOOD T J, et al. Diverse applications of environmental DNA methods in parasitology[J]. Trends Parasitol, 2015, 31(10): 499–513.
- [28] BOHMANN K, EVANS A, GILBERT T P, et al. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring[J]. Trends Ecol Evol, 2014, 29(6): 358–367.
- [29] MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986, 51 Pt 1: 263–273.
- [30] LIVAK J, SCHMITTGEN D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [31] MARDISE R. Next-generation DNA sequencing methods[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008, 9: 387–402.
- [32] XU H, LUO X, LI Y, et al. Applications of environmental DNA approaches to ecological researches[J]. Biotechnol Bull, 2014(10): 49–55.(in Chinese)
徐浩, 罗茜, 李云, 等. 环境 DNA 研究技术及其在生态学领域的应用[J]. 生物技术通报, 2014(10): 49–55.
- [33] SATOM O, RAFALIMANANTSOA A, RAMAROKOTO C, et al. Usefulness of environmental DNA for detecting *Schistosoma mansoni* occurrence sites in Madagascar[J]. Int J Infect Dis, 2018, 76: 130–136.
- [34] FORNILLOS R J C, SATOM O, TABIOSI K B, et al. Detection of *Schistosoma japonicum* and *Oncomelania hupensis quadrasi* environmental DNA and its potential utility to schistosomiasis Japonica surveillance in the Philippines[J]. PLoS One, 2019, 14(11): e0224617.
- [35] SENGUPTA M E, HELLSTRÖM M, KARIUKI H C, et al. Environmental DNA for improved detection and environmental surveillance of schistosomiasis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(18): 8931–8940.
- [36] EYRE M T, STANTON M C, MACKLIN G, et al. Piloting an integrated approach for estimation of environmental risk of *Schistosoma haematobium* infections in pre-school-aged children and their mothers at Barombi Kotto, Cameroon[J]. Acta Trop, 2020, 212: 105646.
- [37] ALZAYLAEE H, COLLINS R A, RINALDI G, et al. *Schistosoma* species detection by environmental DNA assays in African freshwaters [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2020, 14(3): e0008129.
- [38] ALZAYLAEE H, COLLINS R A, SHECHONGE A, et al. Environmental DNA-based xenomonitoring for determining *Schistosoma* presence in tropical freshwaters[J]. Parasit Vectors, 2020, 13(1): 63.
- [39] THOMSEN F, KIELGAST J, IVERSEN L, et al. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA[J]. Mol Ecol, 2012, 21(11): 2565–2573.

收稿日期: 2022-05-05 编辑: 符式刚