

2016—2017 年 RT-PCR 监测湘江长沙综合枢纽工程库区洲滩水体表面日本血吸虫尾蚴

徐明忠, 文岚, 申晓君, 廖瑜, 田斌

长沙市疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410001

摘要: **目的** 监测湘江长沙综合枢纽工程库区洲滩水体表面日本血吸虫尾蚴, 为库区血吸虫感染预警工作提供科学依据。**方法** 按照方案要求在 2016 年与 2017 年的 5 月和 10 月先后进行了 4 次监测, 监测设空白对照, 实验对照和标准对照。对采集的监测样本和对照样本进行过滤和洗涤等前处理后行 RT-PCR 扩增日本血吸虫 SjR2 基因特异性片段。

结果 试验设定的空白对照, 实验对照和标准对照结果符合预期结果, 基因扩增所设阴阳对照成立, 各监测点样本结果阴性。**结论** 基本确定湘江长沙综合枢纽工程运行后库区洲滩水体没有血吸虫尾蚴的存在。但考虑到监测工作的局限性, 建议持续对该水域进行血吸虫尾蚴监测。

关键词: 日本血吸虫; 尾蚴; 监测; 荧光实时定量 PCR; 湘江综合枢纽工程。

中图分类号: R532.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2021)07-0837-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2021.07.016

血吸虫病是经疫水传播的一种寄生虫病, 流行于长江流域及以南的 12 个省份。该寄生虫病曾严重危害人民身体健康和阻碍社会经济发展, 是十分重要的公共卫生问题。经过几十年的不懈努力, 防治成果举世瞩目。至 2015 年, 全国所有血吸虫病流行县都已经达到传播控制标准^[1]。但血吸虫生活史复杂, 流行因素尚未完全消除, 疫情易发生反弹, 因此应该加强监测和风险预警以巩固防治成果。水体尾蚴的监测是疫水监测和预警工作的重要组成部分, 对水体表面尾蚴进行定性和定量检测是确定水体感染性的直接依据^[2]。为评估湘江长沙枢纽工程对库区血吸虫病流行的影响, 本研究组对库区洲滩水体表面血吸虫尾蚴进行检测, 为该地区血吸虫病传播风险监测提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 日本血吸虫核酸检测试剂盒(湖南圣湘生物科技有限公司产品)、多联不锈钢过滤系统, 微孔滤膜规格 $\Phi 47\ \mu\text{m} \times 0.45\ \mu\text{m}$ (广东环凯微生物科技有限公司)、日立高速冷冻离心机 CR22G、Roche LightCycler 480 荧光实时定量 PCR 仪器、磁珠法全自动核酸提取仪及配套试剂(西安天隆科技有限公司)。

1.2 阳性钉螺 由湖南省血吸虫病防治所提供。

1.3 方法 对照设置及样本采集: 监测设空白对照、

实验对照、标准对照。空白对照为湘江长沙段历年无钉螺水域的河水。实验对照是在待测洲滩处放置 1 口长宽各 50 cm 的透明玻璃缸, 取待测水域河水注入玻璃缸, 待上层水澄清后缓缓放入阳性钉螺 5 只, 静置 3 h 后的缸内水样为实验对照。标准对照是取用一定数量的血吸虫尾蚴进行实验。监测点样本的采集方法是由采样人员做好基本防护后采用玻璃烧杯舀取水体表面水 5 L。每监测点每次采水样 3 份, 每份水样采样时间间隔 1 h。每次监测设空白对照 1 个, 标准对照 1 个, 每监测点每次设实验对照 1 个。

样本前处理: 空白对照, 实验对照和待测水样经过多联不锈钢过滤系统过滤后, 取滤纸片放入含 30 ml 纯水的尖底离心管中, 充分浸泡和漂洗。用镊子将滤纸旋转并挤干水分后丢弃。离心管放入高速冷冻离心机 5 000 r/min 离心 15 min, 弃上清。再次注入纯水 30 ml 并充分混匀, 5 000 r/min 离心 15 min, 弃上清。重复上述步骤 2 次, 保留沉渣约 1 ml 用于核酸提取。

核酸提取及扩增检测方法: 核酸提取采用西安天隆科技有限公司生产的全自动核酸提取仪及其配套试剂, RT-PCR 检测采用湖南圣湘生物科技有限公司生产的日本血吸虫核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)和 Roche LightCycler 480 荧光实时定量 PCR 仪。具体方法如下: 取标本前处理沉渣于 1.5 ml 离心管中, 10 000 r/min 离心 3 min。用移液器吸取上清 800 μl 丢弃, 然后将剩余约 200 μl 液体加入全自动核酸提取试剂模块中提取核酸。取核酸 20 μl 加入按试剂盒说明书配置的扩增体系 30 μl 上机扩增。扩增反应变性

基金项目: 长沙市科技计划项目(KQ1602007)

作者简介: 徐明忠, 副主任检验技师, 主要从事病原微生物检验工作。

通信作者: 田斌, E-mail: t. h2002@163. com。

和退火与延伸温度、时间及荧光收集步骤按试剂盒说明书设定。

2 结 果

2.1 监测点的确定 监测点为课题组根据水流速度和洲滩是否适合钉螺滋生为依据进行设定。以水流速度相对缓慢且有钉螺滋生或人畜活动频繁的地方为监测点,监测点的具体位置如图 1 所示。监测点每年在丰水期和枯水期各监测 1 次,即 4—5 月和 9—10 月进行 2 次监测采样,具体采样日期根据天气、气温、光照、风速以及水位情况综合确定。在水体采样的同时进行哨鼠水体感染性试验,具体试验方法见本课题组已发表论文^[3]。



图 1 监测点和对照在地图上的位置

2.2 检测结果 2016—2017 年共进行 4 次监测,每次监测 5 个点。湘江长沙综合枢纽工程下游 2 个监测点,为新康外滩和乔口渡口。上游 3 个监测点,分别是白沙汽渡(东岸)、莲湖外滩和傅家洲。监测样和各对照 RT-PCR 检测结果见表 1。

表 1 2016—2017 年 RT-PCR 监测湘江长沙综合枢纽工程库区洲滩水体表面日本血吸虫尾蚴结果

年度	监测次数	样本类型(n)	结果
2016 年	第 1 次	监测水样(15)	全部阴性(-)
		空白对照(1)	阴性(-)
		实验对照(5)	全部阳性(+)
		标准对照(1)	阳性(+)
	第 2 次	监测水样(15)	全部阴性(-)
		空白对照(1)	阴性(-)
		实验对照(5)	全部阳性(+)
		标准对照(1)	阳性(+)
2017 年	第 1 次	监测水样(15)	全部阴性(-)
		空白对照(1)	阴性(-)
		实验对照(5)	全部阳性(+)
		标准对照(1)	阳性(+)
	第 2 次	监测水样(15)	全部阴性(-)
		空白对照(1)	阴性(-)
		实验对照(5)	全部阳性(+)
		标准对照(1)	阳性(+)

注:①2016—2017 年共进行 4 次监测,每次所采监测水样、空白对照、实验对照、标准对照进行一个批次核酸检测,试剂盒提供的阴阳性对照均成立。②标准对照是在空白对照内加入 3 条尾蚴后与监测水样、空白对照、实验对照一同处理。

3 讨 论

检测水体中血吸虫尾蚴是疫水监测和预警工作的重要组成部分。确定水体中是否含有血吸虫尾蚴是确定水体是否具有感染性的直接指标^[2]。为快速和高效检测重点水域水体表面是否含有血吸虫尾蚴,国内外众多学者对检测方法不断地革新,力求敏感、简便和快速。

动物试验(哨鼠或哨兔),操作复杂,费用较高,敏感性较低。动物需饲养月余后剖杀,因此预警相对滞后。尾蚴感染力受逸出时龄和外界环境的影响较大。叶红专等^[4]比较流动和静态水体尾蚴感染率结果显示,在 25 cm×25 cm(0.0625 m²)的测试框内放置平均 65.6 条尾蚴,水温 26 ,水流速度 0.53 m/s 时,哨鼠死亡率高达 25%,而感染率却低至 1.11%。因此,在传染源控制和钉螺查灭等综合防控措施多元开展的今天,动物试验监测水体尾蚴需要改变。

检获水体表面尾蚴进行形态学识别的方法效率较低,对技术人员要求较高,不易推广。1990 年湖北省潜江市血防机构^[5]对沟渠水面血吸虫尾蚴分布进行探讨时采用了尼龙绢粘取的办法,该研究结果显示每 10 m² 水面可粘取尾蚴 1.37 条。蔡士椿等^[6]在 1996 年发表文章称建立了 C-6 膜粘蚴法检获血吸虫尾蚴率为 40% 左右。湖南省血防所阳桂芬等^[7]进行尼龙网袋捞蚴的阳性率为 16%~33%,而 C-6 膜粘蚴法的阳性检出率为 3.33%,即尼龙网袋捞蚴阳性检出率是 C-6 膜粘蚴法的 5~10 倍,但阳性检出率却依然较低。无论捞蚴还是粘取血吸虫尾蚴,都存在一个不可避免的难题是尾蚴的识别。

在分子生物学飞速发展的今天,利用分子生物学检测技术检测水体尾蚴顺势而出。Hung 等^[8]和王本敬等^[9]分别建立 RT-PCR 检测血吸虫尾蚴,并证明了该法检测血吸虫尾蚴的最低检测限是 1 条尾蚴。本研究为排除改水系生物多样性的影响,以在历年从未检获钉螺区域的水体采集样本作为空白对照,为排除气温、水温、天气和水质等因素的影响设立了实验对照,为排除所采水样检测前的样本处理程序的影响采用实验对照和标准对照加以控制,采用试剂盒提供的阴阳性对照控制核酸提取和扩增过程。此次实验过程中所设立的各种对照成立,水体监测样本检测结果均为阴性,同时开展的哨鼠感染性试验结果亦显示未发现感染的哨鼠。

此次监测方案的制定虽尽可能地考虑到排除一些因素的影响,尽可能地保证监测结果的可靠,但仍然存在以下局限性。第一,虽然在岸边同等条件下设立了