

DB 32

江苏省地方标准

DB 32/T XXXX—XXXX

重组酶介导等温扩增法检测血吸虫核酸

第 1 部分：埃及血吸虫

Detection of nucleic acid of *Schistosoma* by recombinase-aided amplification assay

Part 1: *Schistosoma haematobium*

(报批稿)

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

江苏省市场监督管理局 发布

前 言

DB32/T XXXXX《重组酶介导等温扩增法检测血吸虫核酸》目前分为以下部分：

- 第1部分：埃及血吸虫；
- 第2部分：曼氏血吸虫；
- 第3部分：间插血吸虫；
- 第4部分：日本血吸虫；
- 第5部分：感染性宿主螺。

本文件为DB32/T XXXXX的第1部分。

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由江苏省卫生标准化技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：江苏省血吸虫病防治研究所、首都医科大学附属北京友谊医院、江苏省血液中心、江苏省国际旅行卫生保健中心（南京海关口岸门诊部）。

本文件主要起草人：杨坤、赵松、李伟、张键锋、邹洋、林红、孙立新、张乔乔、黄玉政、施亮、王鑫瑶、何健。

重组酶介导等温扩增法检测血吸虫核酸

第 1 部分：埃及血吸虫

1 范围

本文件规定了检测人体尿液中埃及血吸虫核酸的重组酶介导核酸等温扩增法。
本文件适用于各级疾病预防控制机构和医疗机构对埃及血吸虫核酸的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

埃及血吸虫 *Schistosoma haematobium*

埃及血吸虫为雌、雄异体。雄虫短粗，乳白色，大小为12 mm~20 mm。雌虫前细后粗，形似线虫，深褐色，大小为12 mm~28 mm，雌雄虫呈合抱状。成虫雌雄合抱逆流移行至肠系膜下静脉、痔上静脉，多数成虫至膀胱静脉与盆腔静脉丛产卵，部分虫卵破入膀胱腔，可经尿液排出体外。其流行病学及临床表现参见附录A。

3.2

重组酶介导核酸等温扩增技术 recombinase-aided amplification, RAA

一种利用重组酶、单链结合蛋白和DNA聚合酶在等温条件下（一般为39℃）进行核酸扩增的技术。其原理为：重组酶与引物紧密结合扫描双链DNA，当搜索到与引物同源的序列时，使双链DNA解旋，单链结合蛋白防止单链DNA复性，引物在DNA聚合酶作用下沿模板链延伸，合成新的DNA互补链，5 min~15 min就可实现用仪器检测目的靶标的扩增。

4 仪器与设备

4.1 RAA 恒温核酸扩增检测仪

带有恒温（39℃±1℃）扩增功能的荧光检测仪。荧光检测激发波长480 nm，发射波长520 nm。

4.2 恒温振荡混匀仪

带有恒温功能（39℃±1℃），且能把固体、液体物质充分混匀。

4.3 离心机

相对离心力≥1500 g。

4.4 微量可调移液器

100 μL～1000 μL、20 μL～200 μL、2 μL～20 μL及0.5 μL～10 μL。

5 试剂与材料

5.1 试剂

体液核酸提取试剂盒、RAA扩增反应体系及缓冲液（也可采用等效的商品试剂盒）、无水乙醇和水（符合GB/T 6682分析实验室用水规格和试验方法的要求）。

5.2 材料

离心管（50 mL、1.5 mL）及离心管架、PCR管（0.2 mL）及管架、微量可调移液器配套吸头、一次性使用敷料镊、一次性医用手套和一次性医用口罩。

5.3 引物与探针

扩增埃及血吸虫细胞色素C氧化酶相关基因（COX1）基因的特异性引物及探针，如表1所示。

表1 埃及血吸虫 COX1 基因引物与探针

引物/探针	序列 (5'-3')
正向引物	CTTGATTATATATGCTTAAAAGCTGTGGGTC
反向引物	TAAAGCTATACCAGTAACACCACCTATCGT
探针 ^a	CTGTGGGTCTCGTGTATGAGATCCTATAGTTTGATGATTGGTTGGTTTAA
^a 探针序列的第 31 位碱基修饰荧光报告基团羧基荧光素（FAM）、第 35 位碱基修饰淬灭基团以及第 33 位碱基修饰四氢呋喃残基。	

6 样本前处理与核酸提取

6.1 样本

样本为受试者尿液。

6.2 样本采集

- 6.2.1 登记受检者编号信息，将样本信息贴于洁净尿液收集容器上。
- 6.2.2 采集受检者上午 10 点至下午 2 点之间的尿液，避免粪便污染，女性应避开生理期留取尿液样本。
- 6.2.3 肉眼观察尿液颜色与性状（淡黄、带血或血尿等）并作记录，摇动混匀后采集尿液 5 mL～10 mL，加盖密封保存。

6.2.4 采集后应及时送检，室温下保存时间不超过 4 h；不能及时送检，应 4℃冷藏，保存时间不超过 24 h。

6.3 核酸提取

6.3.1 将采集的尿液移入离心管中，1500 g 离心 5 min 或静置 15 min。

6.3.2 倾倒或吸弃上清尿液，取 200 μL 尿沉渣样本，使用体液核酸提取试剂盒，按照操作说明提取核酸。

6.3.3 取 2 μL 制备好的核酸样本进行检测，或保存至-20℃备用。

7 核酸检测

7.1 向含有 RAA 反应体系的 PCR 管(见附录 B)中加入 45.5 μL 缓冲液。

7.2 在反应管的管盖中加入 2.5 μL 乙酸镁。

7.3 将 2 μL 阴性质控品加入反应管中作为阴性对照，然后将 2 μL 待测样本依次加入不同反应管中，最后将 2 μL 阳性质控品加入反应管作为阳性对照，各反应管总体系为 50 μL。

7.4 将反应管置于恒温振荡混匀仪中，在 39℃下震荡混匀 4 min。

7.5 将反应管置于 RAA 恒温核酸扩增检测仪（也可采用其他等效的荧光检测仪）中进行实时检测，设置反应温度 39℃，时间 30 min。

8 结果判定

8.1 阳性判定

8.1.1 反应结束后，设置斜率为 20，仪器将进行数据分析，自动呈现判定结果。

8.1.2 30 min 内，扩增曲线的斜率 ≥ 20 时判定为阳性；否则判定为阴性，见附录 C。

8.2 质量控制

8.2.1 阳性质控品检测结果判定为阳性；阴性质控品检测结果判定为阴性。

8.2.2 如检测结果不符合 8.2.1 的要求，该实验视为无效，应检查仪器、试剂等的偏差，确认无误后重新检测。

附 录 A
(资料性)
流行病学及临床表现

埃及血吸虫是寄生于人体的主要6种血吸虫之一，引起埃及血吸虫病。病人和带虫者是本病的传染源，极少见其他哺乳动物感染。埃及血吸虫病患者尿中虫卵污染河流、池塘等水源，埃及血吸虫毛蚴钻入水泡螺发育成为尾蚴并逸出，尾蚴通过皮肤或黏膜侵入人体。患者以农民、渔民为主，男女无差别。

埃及血吸虫病主要在非洲和东地中海地区53个国家流行，分别为非洲的阿尔及利亚、安哥拉、贝宁、博茨瓦纳、布基纳法索、喀麦隆、中非、乍得、刚果、科特迪瓦、埃塞俄比亚、加蓬、冈比亚、加纳、几内亚、几内亚比绍、肯尼亚、利比里亚、马达加斯加、马拉维、马里、毛里塔尼亚、毛里求斯、莫桑比克、纳米比亚、尼日尔、尼日利亚、卢旺达、塞内加尔、塞拉利昂、南非、斯威士兰、多哥、乌干达、坦桑尼亚、扎伊尔、赞比亚和津巴布韦，以及东地中海的埃及、伊朗、伊拉克、约旦、黎巴嫩、利比亚、摩洛哥、阿曼、沙特阿拉伯、索马里、南苏丹、苏丹、叙利亚、突尼斯和也门。其中，4个西非国家（布基纳法索、加纳、马里和塞拉利昂）和3个东非国家（马达加斯加、莫桑比克和坦桑尼亚）为重度流行区。埃及血吸虫病可输入中国等非流行地区。

埃及血吸虫可寄生于宿主而引起泌尿生殖道疾病，临床上常有终末血尿、膀胱刺激和尿路梗阻等症状，常与其它原因致泌尿系统感染疾病混淆导致误诊，晚期可引起肾功能衰竭，甚至危及生命。此外，在膀胱组织中沉积的虫卵易导致慢性感染，可进一步引发膀胱鳞状细胞癌。

附 录 B
(规范性)
埃及血吸虫 RAA 反应体系

反应体系中各成分及使用浓度如下：Tris缓冲液30 mmol/L、醋酸钾100 mmol/L、乙酸镁20 mmol/L、二硫苏糖醇6 mmol/L、质量浓度为6 %的聚乙二醇（PEG-35000）、ATP 5 mmol/L、dNTPs 0.4 mmol/L、磷酸肌酸80 ng/μL、单链结合蛋白500 ng/μL、重组酶200 ng/μL、UvsY蛋白200 ng/μL、核酸外切酶200 ng/μL、荧光探针150 nmol/L、DNA聚合酶150 ng/μL、正向引物400 nmol/L和反向引物400 nmol/L。

附 录 C
(规范性)
RAA 法检测结果判读示意图

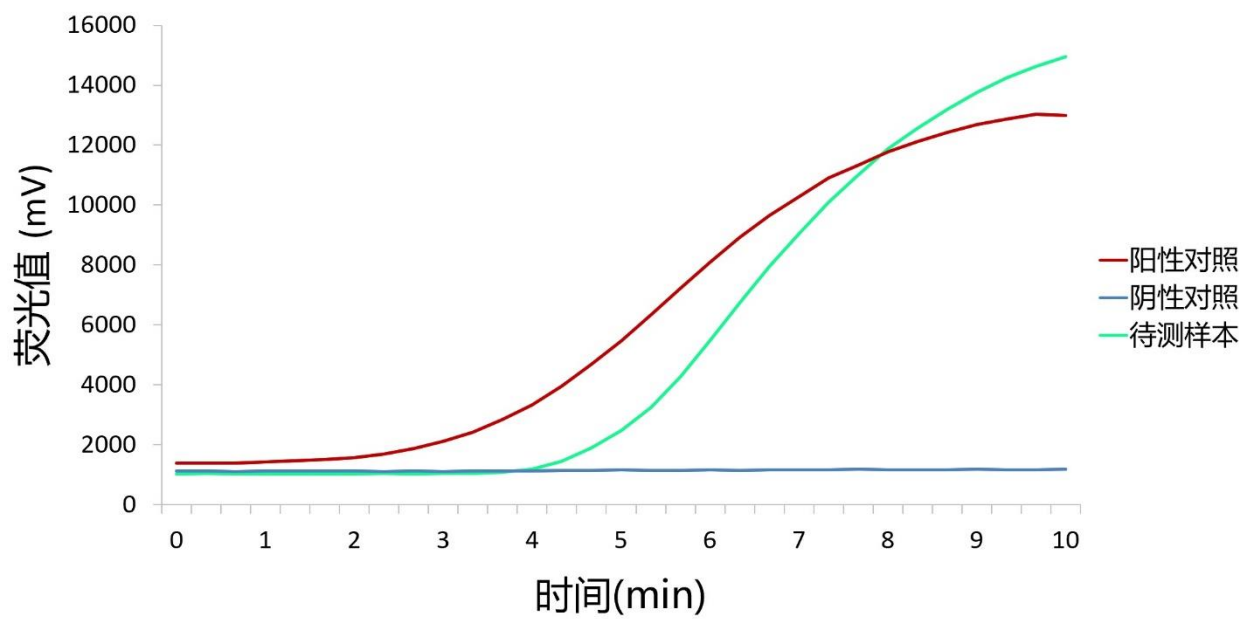


图 1 RAA 法检测结果判读示意图

^a 注 待测样本为受试者尿液提取的核酸

参 考 文 献

1. World Health Organization. (2022). WHO guideline on control and elimination of human schistosomiasis. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/351856>.
 2. World Health Organization. (2021). Diagnostic target product profiles for monitoring, evaluation and surveillance of schistosomiasis control programmes. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/344813>.
 3. Yang K, Mehlhorn H, Cham. Sino-African Cooperation for Schistosomiasis Control in Zanzibar: A Blueprint for Combating Other Parasitic Diseases [M]. Springer. 2021
 4. McManus DP, Dunne DW, Sacko M, et al. Schistosomiasis [J]. Nat Rev Dis Primers. 2018;4(1):13.
 5. 杨坤. 公共卫生援非项目理论与实践 援桑给巴尔血吸虫病防治 [M]. 北京: 人民卫生出版社. 2021
-