

焦虫病诊断技术与早期检测方法研究

玉素甫·加帕尔

吐鲁番市高昌区艾丁湖镇农业发展服务中心

DOI:10.32629/as.v9i7.4112

[摘要] 焦虫病是由巴贝斯虫属原虫侵犯畜体和人体红细胞导致的蜱传人畜共患疾病,对畜牧业生产和人民生命健康造成极大危害。基于此,本文介绍了焦虫病的发生原理与流行的影响因素,在此基础上总结了目前焦虫病诊断方法中存在的不足之处并提出改进措施,通过提升焦虫检测的敏感度、加快移动式快速检测试剂盒的研发进程、完善统一的标准检测程序以及整合跨行业新技术的应用等四个方面来改善现状,希望对焦虫病早期诊断与防控具有借鉴意义。

[关键词] 焦虫病; 巴贝斯虫; 诊断技术; 早期检测; 优化策略

中图分类号: Q96 文献标识码: A

Study on Diagnostic Techniques and Early Detection Methods of Theileriasis

Yusufu·Jiapaer

Agricultural Development Service Center, Aydinghu Town, Gaochang District, Turpan City

[Abstract] Theileriasis is a tick-borne zoonotic disease caused by protozoa of the Babesia genus invading red blood cells of livestock and humans, which causes great harm to animal husbandry production and people's life and health. This paper introduces the pathogenesis and epidemic influencing factors of theileriasis, summarizes the deficiencies existing in current diagnostic methods for the disease, and puts forward improvement measures. The current situation is improved from four aspects: increasing the sensitivity of theileria detection, accelerating the research and development of mobile rapid detection kits, perfecting unified standard testing procedures, and promoting the application of emerging cross-industry technologies. It is hoped to provide reference for the early diagnosis, prevention and control of theileriasis.

[Key words] theileriasis; Babesia; diagnostic technology; early detection; optimization strategy

引言

焦虫病是由巴贝斯虫属原虫寄生于哺乳动物红细胞中造成的一系列被蜱传播的血原虫病,在严重影响牛羊等畜牧业的同时也是一类重要的人畜共患疾病。巴比虫病是仅次于锥虫病的第二大常见的血液寄生虫病,是由于巴贝斯虫属顶复门原虫感染所致。牛巴贝斯虫病在热带和亚热带地区对养牛业造成了严重的破坏,全世界每年因牛巴贝斯虫病所损失的金额大约有130-190亿美元。根据住建部2025年的数据显示,牛焦虫病主要发生在夏秋两季并且老弱孕牛死亡尤为明显。近年来,虽然因分子生物学和免疫技术的发展出现了许多新的检测方法,但由于检测原理的不同,这些方法之间的检测效果相差很大,什么样的方法适合什么样的病例是急需解决的重点之一。因此对焦虫病诊治方法存在的不足及相关早期检测手段进行系统归纳研究对于焦虫病的防治有着深远的意义。

1 焦虫病诊断技术存在的问题

1.1 检测灵敏度与特异性不足

目前血涂片显微镜检查仍然是临床上应用最为广泛的一种焦虫病初步筛查方式,简便易于操作、成本较低廉,但是灵敏度相对较低,在低寄生虫血症期容易出现漏诊现象。在对339头自然感染牛巴贝斯虫病诊断比较试验中,镜检阳性率为31.9%,LAMP为40.7%,传统PCR为41.9%,分子方法检测到的感染率明显高于镜检;LAMP敏感性、特异性均为97.18%、100%,与cPCR基本相同($\kappa=0.98$)。而在另一次对比实验中血片镜检阳性率为68%,PCR可达99%,快速检测试纸检出率为83%。二者之间的巨大差异就表示有较多轻型感染者及无症状感染者会被遗漏掉;在血清学检测中,酶联免疫吸附试验可以检测到特异性抗体,可以在一定程度上增强筛查效果,但是受到抗体的干扰和不同种类动物间血液交叉存在的高假阳性率的影响,仍然会遇到特异性低的问题,而目前最准确的血清学检测手段就是间接免疫荧光法,这种方法需要丰富的实验技巧,而且耗时费力,不适合大规模筛查;而像PCR等分子学检验手段其灵敏度与特异性都有很大的提高,但是对实验室技术和环境的要求都比较高,基层医院无法实现推广使用。

1.2 现场应用条件受限

现有的高特异性检测手段大多是在实验室大批量设计,在现场不能够及时进行初步筛查。血涂片显微镜观察必须依靠显微镜以及专门的阅片医生,在基层兽医站以及野外作业场所无法开展;传统的PCR检测需要精密控温装置,以及专门的分子生物学实验室,一般从采样到出结果需要四个小时左右,达不到及时诊断的效果。而LAMP为代表的一类恒温扩增体系由于只需要简单的恒温仪就可以在恒定温度下迅速对DNA片段进行扩增,近年来成为现场实时检测方面的重要方向之一,通过把LAMP与侧流检测试纸结合起来就能够做到在笔圈旁边进行直观检测了。动物疫病现场诊疗常常需要在恶劣环境中进行,而目前很多分子诊断试剂盒对于使用环境温度、湿度、清洁程度有较高的限制,成为阻碍分子诊断试剂盒现场应用的重要因素之一,在此还存在着多重管检测的问题,即针对不同寄生虫种类引物的设计也不尽相同^[1],导致不能实现统一通用的单管多重检测。而双重TaqMan qPCR可以同时辨别出牛巴贝斯虫和双芽巴贝斯虫,而且它的检测灵敏度也高于巢式PCR方法;而反向线印迹杂交则可以同时判断混合感染的情况,但是它对于双芽巴贝斯虫低水平感染以及带虫状态下的检出能力还是逊于qPCR。

1.3 标准化与规范化不足

焦虫病检测手段多样,在检测方法学规范化及流程标准化上还远远不够。各个检测机构所用PCR引物以及反应体系各异,使得检测结果之间不具有可比性。针对18S rRNA、细胞色素b、AMA-1、RAP-1等靶序列的多用途引物探针的设计可以降低假阴性的出现概率,然而各实验室选取靶标尚没有达成共识。在血清学检测上各厂家提供的酶联免疫吸附试验试剂盒所用抗体种类以及提纯程度各异,造成批间变异大及实验室内波动大,对疫病监测预警以及防控部署带来很大的不确定因素。一种嵌合型ELISA融合了三种B. bovis免疫优势抗原,扩大了菌株覆盖面的同时也提升了检测准确性。但是对于急性感染早期诊断缺少统一的性能评估指标以及质控手段,造成实验室之间结果难以互通的问题。2025年湖北省政府颁布实施DB42/T 2384-2025《犬巴贝斯虫病诊断技术》,明确提出了临床诊断、血涂片镜检、PCR检测、抗体检测及综合判断的标准,但是适用于不同宿主及虫种全国乃至全世界的标准尚未建立起来。

1.4 成本与推广难点

对于资源匮乏的偏远地区来说,检测成本是阻碍新技术应用的主要因素,血涂片镜检成本为15元/头,耗时20min左右,一般使用普通的光学显微镜即可完成检验;PCR检测单项样本的价格为280元/份,需要4h来完成并且要有分子实验室的支持,试纸条价格为65元/头,可在短时间内得到结果,不需要仪器设备,但是灵敏度只有83%左右,处于镜检与PCR之间,灵敏度较高的检测手段往往伴随着较高的价格和复杂的操作程序,而现场即时检测又要尽可能降低对设备和物耗的要求。值得注意的是,一个交叉引物扩增增加垂直流动可视化的新式检测手段,可以检测到2.56 fg/样本,其灵敏度为95.5%,而一次测试只需

要花费不到3.8美元,要比传统PCR便宜了60倍之多。但最先进的检测仪器所需要的质控品,阳性质控品以及校准品却极其依赖进口,导致供应链不稳定又提高了推广的成本。

表1 焦虫病诊断技术存在的问题汇总

问题类别	核心表现	主要技术瓶颈
灵敏度与特异性不足	血涂片镜检阳性率为31.9%,低水平感染容易被忽视;血清学检测有抗体干扰、交叉反应	镜检依赖虫体密度,低感染阈值时检出率显著下降
现场应用条件受限	PCR需4小时以上,依赖精密设备和专业实验室	缺乏适宜野外作业的便携式快速检测工具
标准化与规范化不足	实验室内方法差异大,靶标选择尚未统一	焦虫种属多样(超100种),地区差异明显
成本与推广难点	PCR法单次成本约280元,资源有限地区难以承受	高灵敏技术伴随更高成本投入

2 焦虫病诊断时的早期检测方法优化策略

2.1 提高检测技术灵敏度与准确性

增强诊断敏感性的方法要在多种技术手段上一起进行。以多重靶点联检的分子方案同时对多个高特异性的焦虫基因片段进行检测,可以避免单个位点扩增失败或者引物区发生基因突变而出现假阴性问题,一项关于132个样本的小巴贝斯虫感染检测实验表明LAMP技术的检测灵敏度要比传统的PCR高出十倍以上。CRISPR-Cas12a整合荧光检测技术已经用于犬巴贝斯虫准确快速筛查,基于CRISPR的核酸测序一般采用Cas9, Cas12以及Cas13系统。一种重组酶聚合酶扩增(ERA)加CRISPR/Cas12a二级信号放大的研究在对牛巴贝斯虫独有的SBP2超拷贝保守基因进行靶向后,可以获得高灵敏度、高特异性的视觉检测结果。对于血清学检测特异性的不足问题,可以通过蛋白质微阵列分析的方法来进行系统的寻找焦虫早期感染期特异性的IgM和IgG抗体应答靶点。实验中对30例确诊病例急性期与恢复期血清进行检测,找到17个由IgM/IgG特异识别的抗原,其中有12种是新发现。四个抗原组合检测能发现6个(46.20%)被IFA忽略的PCR阳性的病例,大大提前了血清学转阴的时间点。

2.2 推动便携式与快速检测设备发展

把实验室方法转换到现场使用的仪器是最优的提升焦虫病早期诊断的方向,而LAMP方法简便易行、速度快并且设备非常便宜,已经得到大家的一致认为它是适合资源匮乏区现场筛查的理想选择,研制出来的LAMP方法在72h后依然可以稳定检测,结果几乎与cPCR相同($\kappa=0.98$),作为即时检测的方法具有良好的应用前景;田鼠巴贝斯虫可视化LAMP检测试剂盒已经进行了商业化,在金属浴或者水浴中进行恒温扩增,在30min内用肉眼就可以观察到结果,而且它的检测灵敏度一般是PCR的10倍以上。胶体金免疫渗滤试纸条是利用焦虫病特异性抗体来判定实验结果,在15-20分钟左右就能得到结果并且不需要其他的设备,适合大规模的流行病学调查工作^[2]。一个LAMP与侧向流动测试结合的可视化测试体系已经可以用于现场对牛巴贝斯特病原的直接诊断。微流控技术可以把核酸提取、等温扩增及信号检测等

一系列的过程整合在一个一次性芯片上,采用冷冻干燥试剂包的方式来大大简化整个操作过程以及减少对冷链的需求量。下一步应该重点研发多重等温扩增及侧向层析检测系统,一次取样就能够在短时间内对两个或者多个主要焦虫种类进行检测。

2.3 建立标准化检测体系

标准化检测体系是实现结果互认及疫情比较的前提条件。《牛焦虫病检疫技术规范(SN/T 3485-2013)》标准对牛焦虫病临床观察指标、病原检验、血清学试验等各种检测技术的要求作了详尽规定,并已被世界动物卫生组织认定为法定报告疫病。焦虫病检测标准化应包括样品的采集与保存、DNA的提取方式、靶标的选择及扩增条件还有判定准则以及阳性质控样的制备等多个流程步骤。湖北省2025年的DB42/T 2384-2025《犬巴贝斯虫病诊断技术》地方标准是华中农业大学等单位制定的,明确提出了临床诊断,血涂片显微镜镜检,PCR检测,抗体检测及综合判读的技术规程,适用的范围是临床诊断、实验室诊断、流行病学调查及检验检疫等工作^[3]。该标准出台对区域标准化是一个很好的借鉴。标准体系建设应当得到管理部门、科研院所和检测部门共同参与,应该设立区域性的焦虫标准品库,作为实验室能力评价及试剂盒批次质控的基础,减少人工判读造成的偏差。

2.4 加强多学科技术融合应用

多种技术结合是解决焦虫病早期诊断难题的关键途径。生物传感器技术在近年来取得了飞速的进步,发展了酶联型、免疫型、核酸型、纳米探针型等不同的平台体系,可以对焦虫目标位点进行快捷灵敏的选择性的捕捉。一种新型的核酸检测手段基于CRISPR-Cas12a系统,在现场即时诊断的应用上有着很好的潜力,但是其高昂的价格以及前期繁琐的样本基因组处理限制了它广泛应用于POCT。人工智能图像识别技术的进步使血涂片镜检焕发新生机。利用深度学习算法自动化的识别出红细胞内部的常见寄生虫结构,有希望使得检测精确度由经验判定转变为智能化精确诊断^[4]。多重引物及探针的设计可以大大降低假阴性的概率,各领域交叉后,最终形成从采样准备到结果解读的整

个流水线式的自动诊断仪,真正意义上让养牛户可以在牧场边进行快捷准确检查。

3 结语

焦虫病是一种严重影响畜牧业的发展及公共卫生安全的人兽共患蝉传病,在早期快速准确识别方面对防治该病具有重要意义。目前焦虫病检测在敏感度、携带方便程度、标准规范化以及低成本等问题上还存在很多不足之处。文章对四种常用焦虫病检测技术存在的问题进行了阐述,在提升灵敏度、加快手持式器械的研发进程、制定统一的技术规范与完善跨学科研究合作等四点上提出相应建议措施。未来随着LAMP技术的不断完善,焦虫病检测可达到97%以上的敏感性和几乎百分百的特异性;CRISPR/Cas系统的使用也将使焦虫病检测试剂盒进入到飞摩尔级别的灵敏度水平。但是针对基层的早期快速检测设备还需要大幅度降低价格才能真正意义上完成由实验室研究成果走向临床使用的转变,在这方面需要继续优化CRISPR诊断系统便携式适用性设计;提升CRISPR检测方法多重联检的高通量能力;开发AI辅助诊断系统实现焦虫病的精准检测。让焦虫病检测向集成化、智能化、云网化的方向迈进。

【参考文献】

- [1]程义美.牛焦虫病的流行病学、诊断与防控措施[J].养殖与饲料,2025,24(12):102-104.
- [2]胡英.牛焦虫病的诊断与防治措施[J].畜牧业环境,2025(16):123-124.
- [3]严玉国.牛焦虫病的科学诊疗与综合性强化防治措施的分析[J].中国动物保健,2025,27(03):90-91.
- [4]郭红旭.奶牛焦虫病的诊断与防治[J].兽医导刊,2021(09):39-40.

作者简介:

玉素甫·加帕尔(1975--),男,维吾尔族,新疆吐鲁番人,大专,高级兽医师,研究方向:疫病防控,动物检疫,牛羊疾病诊疗,焦虫病等地方病的预防诊疗。