文章类型：论文|刊号（ISSN）：2630-4678 /（中图刊号）：650GL004

兽医实验室病原快速检测技术的优化与应用

崔艳辉
任丘市农业农村局
DOI:10.12238/as.v8i8.3242

[摘　要] 兽医病原快速检测技术,对于动物疫病防控、食品安全以及公共卫生安全有着非常重要的意义[1]。传统的病原检测技术通常是耗时较长、灵敏度较差,如细菌培养、血清学检测等,已无法满足目前兽医临床诊断需要[2]。近几年来,分子生物学技术、免疫学技术、新兴交叉学科技术的发展,有效地提高了病原检测效率和精准度[3]。本文从兽医实验室病原快速检测技术优化途径(样本前处理、反应体系优化)的角度出发,并结合相关实际案例,说明了病原检测技术领域的研究现状和发展趋势,希望能为兽医诊断技术的发展起到借鉴作用。
[关键词] 兽医诊断；分子生物学；免疫学；病原检测
中图分类号：S852.4　文献标识码：A

Optimization and application of rapid detection technology of pathogens in veterinary laboratory

Yanhui Cui
Renqiu agriculture village bureau

[Abstract] The rapid detection technology of veterinary pathogens is of great significance to the prevention and control of animal diseases, food safety and public health safety [1]. Traditional pathogen detection techniques are usually time-consuming and have poor sensitivity, such as bacterial culture and serological detection, which can no longer meet the needs of veterinary clinical diagnosis [2]. In recent years, the development of molecular biology technology, immunology technology and emerging technology has effectively improved the efficiency and accuracy of pathogen detection [3]. From the perspective of optimizing the rapid detection technology of pathogens in veterinary laboratories (sample pretreatment, reaction system optimization), and combining with relevant practical cases, this paper explains the research status and development trend in the field of pathogen detection technology, hoping to play a reference role for the development of veterinary diagnostic technology.
[Key words] veterinary diagnosis; molecular biology; immunological; pathogen detection

动物疫病暴发不仅会给养殖业造成巨大的经济损失,而且可以引起人畜共患传染病的发生(例如：禽流感、狂犬病),严重威胁人类健康,其威胁程度随着人们生活水平的提高以及动物产品的消费升级也在不断扩大。传统的病原检测方法(细菌培养、病毒分离等),一般需要数天甚至数周才能出结果,很难实现快速诊断。如何获得高效、敏感和特异性高并且能快速检测的方法一直是兽医实验室努力研究的重点。近几年来,随着分子生物学和免疫学的发展,兽医病原检测得到了很大的革新。聚合酶链式反应(PCR)、环介导等温扩增(LAMP)、以及酶联免疫吸附试验(ELISA)等检测技术被广泛应用在动物疫病的检测中,同时微流控芯片、生物传感器技术也逐渐在检测领域得到应用,提高了检测的便携性以及自动化水平[4]。综上所述,本文总结并提出了兽医病原快速检测技术的优化途径及应用,以及对其后续发展的展望,希望能为兽医诊断技术的发展起到借鉴作用。

1 病原检测技术概述

1.1分子生物学检测技术

1.1.1聚合酶链式反应技术

PCR是利用DNA聚合酶催化靶序列复制扩增而实现的检测方法。常规PCR可检测病原的核酸但灵敏度只有102-103 copies/μL,只能定性不能定量;为进一步提高检出水平和准确性,在原有PCR技术的基础上发展出了实时荧光定量PCR(qPCR)技术,可在实验过程中实时监测扩增产物的量,并且具有更优的特异性和敏感性,灵敏度可达1-10copies/μL,并可定量。

1.1.2等温扩增技术

代替传统的PCR,LAMP技术能够在60～65℃恒温下,以4～6条特异引物催化靶序列的扩增反应,其检测灵敏度可达10

文章类型：论文|刊号（ISSN）：2630-4678 /（中图刊号）：650GL004

copies/反应,其产物可以使用浊度仪或者观察到焦磷酸镁的沉淀,特别适用于基层单位的使用。重组酶聚合酶扩增(RPA)可在37-42℃的条件下于20min内完成核酸扩增过程,要求的仪器设备较少。我国研制了基于LAMP技术的禽流感病毒(AIV)H5亚型现场检测试剂盒,在田间试验中与qPCR相比二者一致性达96.8%。

1.1.3高通量检测技术

基因芯片技术以固相载体上探针阵列为平台,实现一次性检测数百种病原的目的,广泛应用于野生动物疫源调查；此外,纳米孔测序技术可实现实时、长读、长测序。在野生动植物中应用于未知病原发现,野外观测结果最快可在6—8h完成检出。

1.2免疫学检测技术

1.2.1酶联免疫吸附试验技术

ELISA是通过酶标抗体催化显色反应检测pg级抗原的技术,间接ELISA用于测定抗体量,例如可以评价口蹄疫疫苗的效果；直接ELISA可以测定抗原量；而化学发光ELISA由于用到了高灵敏的化学发光法,将检测灵敏度提高10～100倍以上,但需要用专门仪器才能完成检测任务。

1.2.2免疫层析技术

胶体金免疫层析试纸条,利用毛细作用将样本带入完成整个反应,最终抗原-抗体复合物停留在检测线上,使检测线显色；犬细小病毒(CPV)检测试纸在10min之内就可以获得结果,临床符合率大于90%；荧光微球免疫层析技术使用时间分辨荧光微球标记,灵敏度可达0.1-1ng/mL,已用于布鲁氏菌病的现场筛查。

1.2.3新型免疫分析技术

基于SPR的生物传感器无需标记就可以实现快速准确的定量检测,在牛结核分枝杆菌的检测灵敏度可达92.3%；量子点荧光免疫分析,采用量子点材料具有较窄的发射光谱这一特点,可以实现多指标的同时检测,在禽流感病毒分型上具备独特的优势。

1.3新兴交叉学科技术

除了上述介绍的分子生物学检测技术与免疫学检测技术外,目前还出现了新兴交叉学科技术。如微流控芯片技术,该技术利用微米级通道实现样本处理、反应和检测一体化,离心式微流控芯片可将“样本进、结果出”的时间缩短到30min以内；数字微流控利用电润湿效应操控液滴,将病毒检测灵敏度提高到了单分子水平。如生物传感器技术,该技术主要用到纳米材料作为传感器的核心器件。场效应晶体管生物传感器用石墨烯等纳米材料修饰的检测下限为1.5PFU/mL。

2 兽医实验室病原快速检测技术的优化途径

2.1样本前处理优化

为了增加提取率以及缩短时间,改进的核酸提取方法有两种。第一种,传统离心柱法耗时较长(约60min),并且受操作影响较大；而磁珠法则可以通过磁性颗粒特异性结合核酸的方式与自动化设备配合,达到减少耗时的目的,同时回收率会提升20-30%。第二种,经过氨基化修饰后的硅基磁珠,其RNA吸附量能够提高40%,适用于高降解样本。集成化试剂盒开发：市面上所有一步法磁珠试剂盒都可以完成裂解、结合、洗脱步骤,猪瘟病毒核酸提取效率可达95%以上。

表1 不同分子生物学检测技术比较

技术名称	原理	优势	局限性	主要应用场景
PCR	通过DNA聚合酶扩增特定DNA片段	操作简单、成本低、灵敏度高	仅能定性检测,无法定量；易受污染影响	基因克隆、病原体筛查(如ASFV、AIV)
实时荧光定量PCR	结合荧光探针实时监测扩增	可定量检测,特异性强	依赖精密仪器,通量较低	病毒载量检测、基因表达分析
数字PCR	将样本分割为微滴,独立扩增后统计阳性信号	定量,抗抑制剂能力强,灵敏度更高	设备昂贵,数据分析复杂	低频突变检测
环介导等温扩增	在恒温下通过4-6条引物扩增	肉眼判读结果,适合现场检测	引物设计复杂,易产生非特异性扩增	基层疫病筛查(如非洲猪瘟、禽流感)
基因芯片	固定探针与样本核酸杂交,通过荧光信号检测	高通量,自动化程度高	灵活性低,成本高	多病原联合检测
纳米孔测序	通过电信号变化识别穿过纳米孔DNA碱基	实时测序,便携式设备	原始错误率高(5-15%),需生物信息学校正	野外病原监测、复杂结构变异检测

为了实现现场检测,免提取直接扩增技术备受关注,通常有两种方法。第一种,将95℃加热5min可以破坏病毒衣壳,酶联免疫试剂盒抑制剂耐受型聚合酶,从而可以将非洲猪瘟病毒的检测限降到100copies/mL。第二种,含有胍盐以及Triton X-100裂解液能够穿过细胞膜释放核酸,已经成功的被运用到禽流感病毒LAMP快速检测当中。

前处理样本之后,样本需要保存,还需要优化运输样品。通常涉及到两种技术。第一种,WhatmanFTA卡可以在常温下保存1个月的核酸,在偏远地区能用于样本的运输。第二种,含有β-丙内酯的保存液既可以灭活病毒又能保证核酸的完整性,在口蹄疫病毒检测中得到了广泛应用。

2.2反应体系优化

2.2.1引物与探针设计优化

采用生物信息学方法筛选高特异性引物。以ASFV p72基因保守区为模板设计引物,可用于检测ASFV全部24个基因型。要注意避免猪圆环病毒(PCV)检测引物和猪基因组中存在的同源序列匹配。ZEN/Iowa Black淬灭基团可将qPCR探针背景荧光降低50%。将探针Tm值上移2～4℃可以大幅度提高单碱基分辨能力,并且杂交信号明显提高。

2.2.2酶学体系改进

耐热逆转录酶：MMLV-RT H^+在55℃时活性提高3倍,适合于高GC含量模板的PCR反应。抑制剂耐受型DNA聚合酶,如SDPolymerase,在20%全血存在下也能正常扩增,有利于直接使用血液样本。

文章类型：论文|刊号（ISSN）：2630-4678 /（中图刊号）：650GL004

2.3设备与耗材改进

为了便于检测,研发了便携式检测设备。如微型qPCR仪：原来BioRad CFX Connect体积减小了70%,并且是使用电池作为支撑,所以它能够在户外使用。如智能手机读值系统：利用手机摄像头拍摄记录了LAMP浊度的变化,用APP(VetLAMP系统)进行分析,正确率达98%。

3 兽医实验室病原快速检测技术的应用案例

3.1现场快速检测非洲猪瘟病毒(ASFV)

中国农科院创制了将RPA-CRISPR技术联用的方法,再用CRISPR-Cas12a系统特异识别靶序列,并切割荧光报告分子,在侧向流试纸条上显示结果。最低检测限可达1 copy/μL,40min内可以测出结果,并且能够区分野毒株和疫苗株。如利用RPA-CRISPR技术,四川省某规模化猪场对到场生猪用唾液进行采样后,于40min内即可出具检测报告,并实现了采样和检验同步完成,在2023年全年完成采样量近5万份,检出阳性率为0.3%,有效支撑精准扑杀工作。

3.2牛腹泻病原的高通量鉴定

河北农业大学的团队利用纳米磁微粒富集联合荧光定量PCR的技术,研发了对多种病原实现快速检测的方法,用偶联特异性的核酸探针来富集样本中的病原。借助金纳米粒子放大信号,将检测试剂灵敏度提高到传统PCR检测的500-1000倍,一套384孔板可以在4h完成36个样本的5种病原的筛查工作。

表2 技术应用对比

案例	核心技术	检测时间	灵敏度	应用价值
ASFV 筛查	RPA-CRISPR/微流控 LAMP	40 min/30 min	1 copy/μL	实现"早发现、早处置"
牛腹泻多病原检测	纳米富集-qPCR/RPA 试纸	4 h/15 min	0.1 fg/μL	破解混合感染鉴别难题

4 结论

兽医实验室病原快速检测技术的快速发展为动物疫病防控提供了技术保障。本部分主要介绍目前所用到的几种主要的检测技术优化方法及其应用效果。分子生物学检测技术通过对多重引物设计、酶体系的改进及抗干扰等措施使得检测能力得到极大的提升,qPCR技术的灵敏度达到1~10copies/μL,LAMP等温扩增技术实现了不依赖精密仪器的现场检测。免疫学技术通过标记物的创新及载体的优化实现了10~15min内的检测。通过实践证明,优化的技术在检测上都展现出了较为优越的效果,在非洲猪瘟防控中CRISPRCas系统可将检测时间缩短到40min,检测限可达到1copy/μL；在牛腹泻的诊断上,可以利用纳米富集技术同时检测多种病原,提高了检出率30%以上,并且为防控提供有效依据。

[参考文献]

[1]翟文磊,张爱栎,王蒙,等.生物纳米孔分析技术用于食品污染物快速检测的研究进展[J].分析测试学报,2015(1):15.

[2]刘英政,董志珍,田绿波,等.多重核酸-质谱技术在口岸呼吸道传播病原检测中的应用前景[J].口岸非传统安全学刊,2025,2(03):37-41.

[3]郑德论.中空薄壁CuO@碳纳米花异质结构建高灵敏度光电化学传感平台检测林可霉素[J].分析试验室,2025(1):8.

[4]李业,闻东亚,周赵凡,等.基于CRISPR-Cas13a的免扩增电化学生物传感器快速检测牛病毒性腹泻病毒[J].生物工程学报,2025(1):17.

作者简介：

崔艳辉(1978--),男,河北省沧州市任丘市人,大学本科,畜牧(兽医)师,兽医。