

# 牛支原体环介导等温扩增技术结合横向流动试纸条检测方法的建立

王雅茜<sup>1</sup>, 胡云皓<sup>2</sup>, 王豪杰<sup>2</sup>, 岳怀宁<sup>2</sup>, 辛凌翔<sup>2</sup>, 潘瑶<sup>4</sup>, 刘燕<sup>2</sup>, 王震<sup>1,3</sup>, 陈创夫<sup>\*1,3</sup>, 朱良全<sup>\*2</sup>

1 石河子大学 动物科技学院, 新疆 石河子 832003

2 中国兽医药品监察所, 北京 100081

3 绵羊健康养殖与人兽共患病防控同创新中心, 新疆 石河子 832003

4 四川省甘孜藏族自治州畜牧业科学研究所, 四川 康定 626000

王雅茜, 胡云皓, 王豪杰, 岳怀宁, 辛凌翔, 潘瑶, 刘燕, 王震, 陈创夫, 朱良全. 牛支原体环介导等温扩增技术结合横向流动试纸条检测方法的建立[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 5229-5239.

WANG Yaqian, HU Yunhao, WANG Haojie, YUE Huaining, XIN Lingxiang, PAN Yao, LIU Yan, WANG Zhen, CHEN Chuangfu, ZHU Liangquan. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with lateral flow dipstick (LFD) for detection of *Mycoplasma bovis*[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 5229-5239.

**摘要:**【背景】牛支原体(*Mycoplasma bovis*)是引起牛乳房炎、关节炎及呼吸道疾病等的重要病原体之一, 严重危害养牛业的健康发展。【目的】建立一种便捷、快速、灵敏和特异的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术结合横向流动试纸条(lateral flow dipstick, LFD)方法用于牛支原体的检测。【方法】对牛支原体 P48 特异性基因序列进行对比, 选择保守性区域。运用 Primer Explorer V5 在线软件设计引物, 并通过荧光染料法与以 *oppD/F*、*oppD*、*urvC* 为靶基因所设计的 LAMP 引物进行比较。对筛选出的最佳 P48 引物组的内引物(FIP/BIP)用生物素和 6-羧基荧光素标记; 利用单一控制变量法对反应温度、时间与引物浓度比进行优化; 将 LAMP 检测方法与 LFD 相结合。最后评价该方法的敏感性、特异性、重复性及临床应用效果。【结果】P48 LAMP 引物组荧光信号更强,  $C_t$  值较小, 扩增效率较高, 优于已报道的 LAMP 引物组; 当反应温度为 60 °C、引物(F3/B3:FIP/BIP)浓度比为 1:4、反应时间为 40 min 时最佳; 最低检测浓度为 17.28 fg/ $\mu$ L, 比行业标准 PCR 检测方法灵敏 1 000 倍; 与多杀性巴氏杆菌、牛疱疹病毒等 9 种引起牛呼吸道疾病相关病原体均无交叉反应; 批间与批内试验均一致; 运用该方法对 39 份临床鼻拭子的检出率为 28.21%, 高于行业标准的 PCR 法(检出率 23.07%)。【结论】成功建立一种敏感、特异以及便于基层使用的牛支原体 LAMP-LFD 检测方法, 为防控牛支原体病提供了技术支持。

**关键词:** 牛支原体; 环介导等温扩增技术; 横向流动试纸条; P48 基因

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1800703); 国家自然科学基金(32002245, U1803236)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1800703) and the National Natural Science Foundation of China (32002245, U1803236).

\*Corresponding authors. E-mail: CHEN Chuangfu, ccf-xb@163.com; ZHU Liangquan, 1367391894@qq.com

Received: 2024-05-03; Accepted: 2024-06-01; Published online: 2024-06-26

# Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with lateral flow dipstick (LFD) for detection of *Mycoplasma bovis*

WANG Yaqian<sup>1</sup>, HU Yunhao<sup>2</sup>, WANG Haojie<sup>2</sup>, YUE Huaining<sup>2</sup>, XIN Lingxiang<sup>2</sup>, PAN Yao<sup>4</sup>, LIU Yan<sup>2</sup>, WANG Zhen<sup>1,3</sup>, CHEN Chuangfu<sup>\*1,3</sup>, ZHU Liangquan<sup>\*2</sup>

1 College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China

2 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

3 Collaborative Innovation Center for Sheep Health Breeding and Zoonosis Prevention and Control, Shihezi 832003, Xinjiang, China

4 Animal Husbandry Science Institute of Ganzi Tibetan Autonomous Prefecture of Sichuan Province, Kangding 626000, Sichuan, China

**Abstract:** [Background] *Mycoplasma bovis* is one of the major pathogens causing bovine mastitis, arthritis, and respiratory diseases, seriously endangering the healthy development of the cattle industry. [Objective] To establish a convenient, rapid, sensitive, and specific method based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with lateral flow dipstick (LFD) for the detection of *M. bovis*. [Methods] The conserved region was selected by comparison of the *P48* specific sequence of *M. bovis* and used to design primers by Primer Explorer V5 online. The designed primers were compared with the LAMP primers designed with *oppD/F*, *oppD*, and *urvC* as target genes by the fluorescent dye method. The optimal internal primers (FIP/BIP) designed based on *P48* were labeled with biotin and 6-carboxyfluorescein, respectively. The reaction temperature, time, and primer concentration ratio were optimized by the single factor method. LAMP was combined with LFD for the detection of *M. bovis*. Finally, the sensitivity, specificity, repeatability, and clinical application effect of the established method were evaluated. [Results] The LAMP primers designed based on *P48* had stronger fluorescence signal, lower Ct value, and higher amplification efficiency, outperforming the reported LAMP primers. The reaction conditions were optimized as 60 °C, primer concentration ratio (F3/B3:FIP/BIP) of 1:4, and 40 min. The lower limit of detection of the established method was 17.28 fg/μL, which was 1 000 times lower than that of the PCR method, the standard method in the industry. There was no cross-reaction with 9 pathogens causing bovine respiratory diseases, such as *Pasteurella multocida* and bovine herpes virus (BHV). The results of inter-batch and intra-batch tests were consistent. The detection rate of 39 clinical nasal swabs by the established method was 28.21%, which was higher than that (23.07%) of the PCR method. [Conclusion] A sensitive, specific, and easy-to-use LAMP-LFD method for detecting *M. bovis* was successfully established, which provided technical support for the prevention and control of *M. bovis*.

**Keywords:** *Mycoplasma bovis*; loop-mediated isothermal amplification; lateral flow dipstick; *P48*

牛支原体(*Mycoplasma bovis*)是引起牛呼吸道疾病、乳房炎及关节炎等疾病的重要病原体<sup>[1]</sup>。其可通过气溶胶及垂直传播等方式感染水牛、肉牛等不同品种的牛,且各个年龄段牛都易感。此外,牛支原体易与多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)、溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*)等呼吸道常见病原发生混合感染,侵袭犊牛呼吸系统,导致较高发病率、死亡率及重大经济损失<sup>[2]</sup>。因此,对于牛支原体病的鉴别诊断显得尤为重要。

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)能在等温(60–65 °C)条件下,短时间(<1 h)内进行核酸扩增,是一种快速、敏感和特异的基因扩增方法<sup>[3]</sup>。横向流动试纸条(lateral flow dipstick, LFD)可以通过 6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein, 6-FAM)标记的引物与生物素标记的 LAMP 扩增产物特异性杂交,与试纸条上包被生物素抗体的检测线结合,即在 LFD 上完成显色,具有操作简单、可现场显示结果等显著优势<sup>[4]</sup>。将二者结合建立的检测方法已广泛应用于细菌<sup>[5]</sup>、病毒<sup>[6]</sup>和寄生虫<sup>[7]</sup>的检测。然而,目前尚未有将该方法应用于牛支原体检测的报道。

靶基因选择对建立 LAMP 检测方法至关重要。目前用于牛支原体检测的基因主要包括 *oppD/F*、*urvC*、*polC* 等<sup>[8–10]</sup>。研究显示,牛支原体的 *P48* 基因高度保守,同源性高达 99.58%,与无乳支原体(*Mycoplasma agalactiae*)的同源性约 81%,以 *P48* 基因为靶标可将二者进行区分<sup>[11]</sup>。包世俊等<sup>[12]</sup>以 *P48* 基因为靶标建立的 PCR 检测方法,特异性较好,与无乳支原体、丝状支原体亚种等均无交叉反应。

因此,本研究以 *P48* 基因特异性片段为靶标设计引物,并通过荧光染料法与以 *oppD/F*、*oppD*、*urvC* 为目标基因设计的 LAMP 引物进

行比较<sup>[12–14]</sup>,对筛选出的最优引物组 LAMP 内引物(FIP/BIP)分别标记生物素(biotin)和 6-羧基荧光素(6-FAM),然后将 LAMP 与 LFD 结合,以期建立一种可视化、便捷化、适用基层的牛支原体 LAMP-LFD 检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 核酸及临床样品

牛支原体(*Mycoplasma bovis*)、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)、溶血曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、产单核细胞李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、牛病毒性黏膜病/腹泻病病毒(bovine viral diarrhoea virus, BVDV)、牛疱疹病毒(bovine herpesvirus, BHV)、无乳支原体(*Mycoplasma agalactiae*)、精氨酸支原体(*Mycoplasma arginini*)等核酸样品均由中国兽医药品监察所制备提供。39 份四岁左右健康散养牦牛鼻拭子于 2023 年 5 月采自四川省甘孜藏族自治州部分地区。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

*Bst* II DNA Polymerase、5×LAMP Reaction Mix 和荧光染料 TS LAMP Green (20×),北京全式金生物技术有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒和高效口腔拭子基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;病毒 DNA/RNA 提取试剂盒, TaKaRa 公司;单重核酸检测试纸条,生工生物工程(上海)股份有限公司; BM 2000 DNA Marker, 北京博迈德基因技术有限公司。核酸蛋白测定仪 NanoDrop, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; PCR 仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; 三孔恒温水浴锅, 北京方通达科科技有限公司; 恒温金属浴, 杭州瑞诚仪器有限公司。

## 1.2 LAMP 引物设计

根据 NCBI 公布的牛支原体 *P48* 基因 (GenBank 登录号: CP002188.1), 利用 MEGA 11 进行比对, 应用 Primer Explore V5 在线软件 (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>) 设计引物, 本研究所设计引物及已报道的引物均由北京六合华大基因科技有限公司合成(表 1)。引物工作浓度均为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。

## 1.3 引物筛选

通过荧光染料法筛选出高特异性、扩增效果较好的引物组进行试验。荧光染料法 LAMP 体系(25  $\mu\text{L}$ ): 5 $\times$ LAMP Reaction Mix 5  $\mu\text{L}$ , *Bst* II DNA Polymerase 2  $\mu\text{L}$ , TS LAMP Green (20 $\times$ ) 0.45  $\mu\text{L}$ , FIP/BIP (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 4  $\mu\text{L}$ , B3/F3

(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 模板 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足 25  $\mu\text{L}$ 。反应温度 60  $^{\circ}\text{C}$ , 40 个循环, 每分钟收集 1 次荧光信号。选取  $C_t$  值较小且荧光信号较强的引物组, 在 FIP 和 BIP 5'端分别用 biotin 和 6-FAM 进行标记。

## 1.4 LAMP 反应体系和条件优化

运用单一控制变量法分别对反应温度、反应时间和引物浓度比进行优化。反应温度分别设置为 58、59、60、61、62、63、64 和 65  $^{\circ}\text{C}$ ; 反应时间分别设置为 15、20、25、30、35、40 和 45 min; 内外引物浓度比(F3:FIP 和 B3:BIP) 分别设置为 1:1、1:2、1:4、1:6、1:8 和 1:10。反应产物经 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 选择条带较亮时的条件。

表 1 LAMP 引物信息

Table 1 LAMP primer information

基因	引物名称	序列	来源
Gene	Primer name	Sequence (5'→3')	Source
<i>P48</i>	F3	CACACATCGTGTCTCGTAA	This study
	B3	TCACCCTTTTTAGGTTTCGTAA	
	FIP	Biotin-CCTTCATCAGTTATAAATGCTGCCCTTAAACTAAGAGATGGTTTAAACCG	
	BIP	6-FAM-CATTCAATCAATCTGGTTGAGAAGCTTATTACCACTAACTTGC GC	
<i>oppD/F</i>	F3	CCATCTAGCACATTTTTTCCT	[13]
	B3	TCTAATTCGTCAAAAAGTGACAT	
	FIP	TGAGCTTCCATTGTTTGTCTTCTACTAATTGACTTTAAGTTGACTGG	
	BIP	ATGAGATGTACTCAAACACAGATCACATTATTTCTAAACTGCGCTTG	
	LF	AAGAAACAAAATTTTCATCAATAGA	
	LB	ATGGCTTCTATTACGAAAAGCAA	
<i>oppD</i>	F3	ACTAATCCAGCTCACCCCTTA	[14]
	B3	CGTTGCTGCTTTATGATGAC	
	FIP	TGGGGTTCCTTGAATTGAGAATAATTACATGAGCGCTTATCTCG	
	BIP	CAGATATGGCAAACCTTACCTATCGGGGTGGTTCTTTTTTCATAGTCAA	
	LA	TCTCATCATCATTTTTAGGTATAGC	
	LB	TGACCCTTTTGCACCTAGAA	
<i>urvC</i>	F3	AGAAACAGACAAAAAATTAGTTCAC	[15]
	B3	AAGCACCTATTGATTTTTACTC	
	FIP	GATTTTTGCATAGCTTTTAAAGTGAGAAGGCAAACCTAAGAAACATAAAAGG	
	BIP	GACGCTTCAGTTGAAGAATTATCAAATCCTTATTTTTAATGCTTTTGGC	
<i>oppD/F</i>	F	TTTTAGCTCTTTTTGAACAAAT	[16]
	R	GGCTCTCATTAAGAATGTC	

### 1.5 牛支原体 LAMP-LFD 方法的建立

取 5  $\mu\text{L}$  LAMP 扩增产物用生理盐水稀释 20 倍, 混匀, 取 80  $\mu\text{L}$  稀释后的反应产物滴于商品化核酸试纸条加样孔中, 于 15 min 内记录判读区检测结果。此外, 分别用 PCR 仪、金属浴和水浴锅诊断试剂进行恒温反应, 验证不同仪器的适用性。

### 1.6 特异性试验

分别以牛支原体(*M. bovis*)、多杀性巴氏杆菌(*P. multocida*)、溶血曼氏杆菌(*M. haemolytica*)、大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、产单核细胞李斯特菌(*L. monocytogenes*)、牛病毒性黏膜病/腹泻病病毒(BVDV)、牛疱疹病毒(BHV)、无乳支原体(*M. agalactiae*)、精氨酸支原体(*M. arginini*)的核酸为模板, 利用本研究建立的 LAMP-LFD 方法进行检测, 验证该方法的特异性。使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取支原体和细菌的核酸样品, 用病毒 DNA/RNA 提取试剂盒提取病毒核酸。

### 1.7 敏感性试验

以初始浓度为 172.8 ng/ $\mu\text{L}$  牛支原体基因组

为模板, 用超纯水进行 10 倍梯度稀释。利用本研究建立的 LAMP-LFD 方法及常规 PCR 法同时检测<sup>[15]</sup>, 比较该方法与常规 PCR 法的敏感性。

### 1.8 重复性试验

制备 3 批诊断试剂对阳性样品和双蒸水产品进行批间与批内试验, 验证其重复性。

### 1.9 临床样本检测

对采集的 39 份牦牛鼻拭子使用高效口腔拭子基因组 DNA 提取试剂盒进行核酸提取, 利用本研究建立的 LAMP-LFD 方法进行检测, 同时使用牛支原体行业标准 PCR 法<sup>[16]</sup>对样品进行检测, 验证该方法的临床应用效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 LAMP 引物筛选结果

通过荧光染料法分别对 4 组 LAMP 引物进行检测。结果显示, 以 *P48* 基因为靶标设计的引物荧光信号更高,  $C_t$  值较小, 扩增效率较高, 优于已报道的引物(图 1)。因此, 选择 *P48* LAMP 引物组进行条件优化, 并对其内引物(FIP/BIP)分别标记 biotin 和 6-FAM, 以便后续与 LFD 结合。

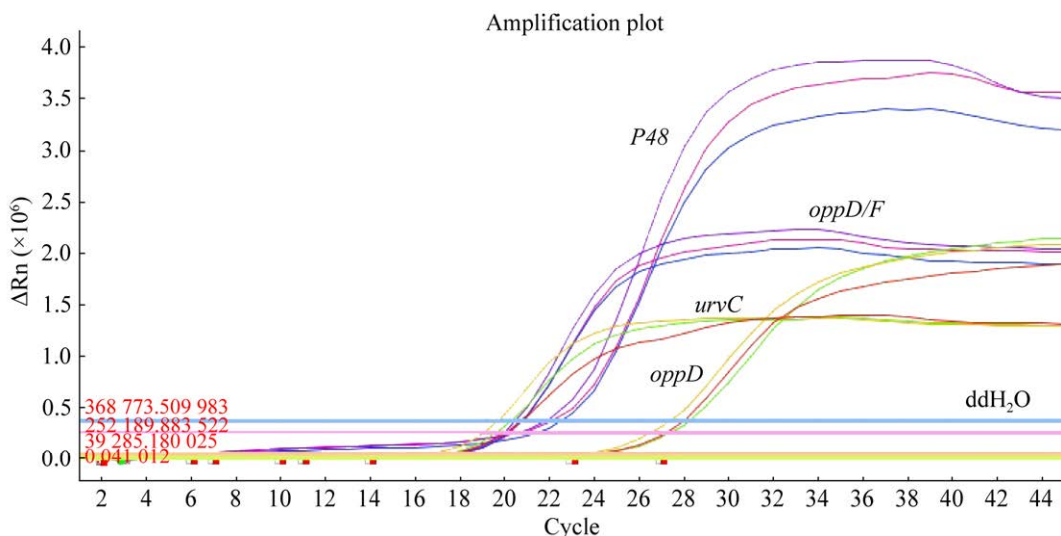


图 1 LAMP 荧光染料法扩增结果

Figure 1 LAMP fluorescent dye amplification results.

## 2.2 条件优化结果

运用单一控制变量法分别对反应温度、反应时间和引物浓度比进行优化。如图 2A 所示, 当反应温度为 60 °C 时, 梯形条带最亮; 如图 2B 所示, 当反应时间为 40 min 时梯形条带的亮度与反应 45 min 时基本一致; 如图 2C 所示, 当引物浓度比(F3:FIP 和 B3:BIP)为 1:4 时, 梯形条带较清晰、明亮。

## 2.3 LAMP-LFD 结果判读

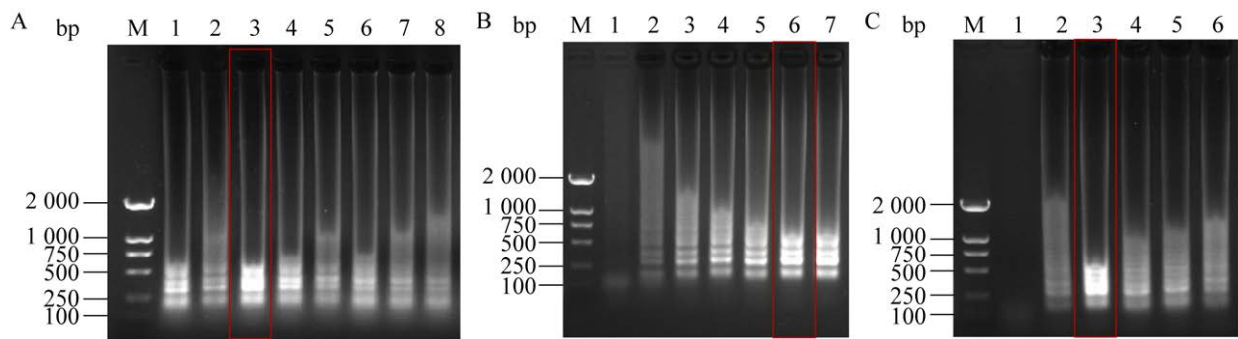
结果判定(图 3A): (1) 若质控区 C、检测

区 T 均出现显色条带, 则待检样品中含牛支原体核酸; (2) 若质控区 C 出现显色条带, 检测区 T 未出现条带, 则待检样品中不含牛支原体核酸; (3) 若质控区 C 未出现阳性条带, 无论检测区 T 是否出现阳性条带, 检测均视为无效。

分别用 PCR 仪、金属浴和水浴锅诊断试剂进行恒温反应, 结果均一致(图 3B), 表明该方法适应性较好。

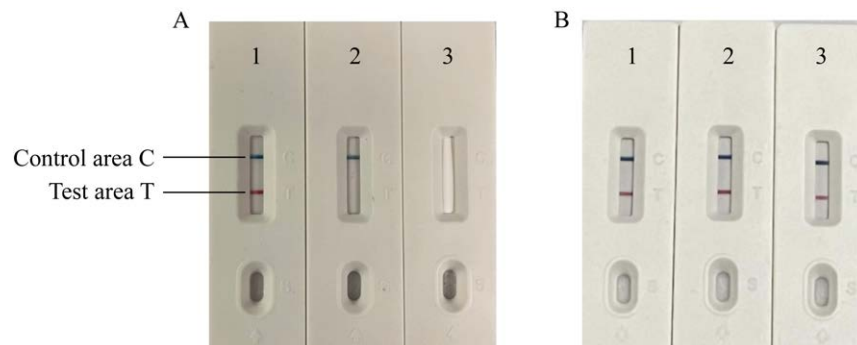
## 2.4 特异性结果

利用该方法分别对牛支原体(*M. bovis*)、多



**图 2 LAMP 条件优化** A: 不同反应温度. 1-8: 58、59、60、61、62、63、64、65 °C. B: 不同反应时间. 1-7: 15、20、25、30、35、40、45 min. C: 不同引物浓度比. 1-6: 1:1、1:2、1:4、1:6、1:8、1:10. M: DL2000 DNA 分子质量标准

Figure 2 Optimization of LMAP conditions. A: Different reaction temperature. 1-8: 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 °C. B: Different reaction time. 1-7: 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 min. C: Different reaction primer concentration ratio. 1-6: 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10. M: DL2000 DNA Marker.



**图 3 LMAP-LFD 结果判读示例(A)及在不同仪器中的检测(B)** A 中 1: 阳性; 2: 阴性; 3: 无效. B 中 1: PCR 仪; 2: 水浴锅; 3: 金属浴

Figure 3 Example of LMAP-LFD result interpretation (A) and detection of LAMP-LFD in different instruments (B). A: 1: Positive; 2: Negative; 3: Invalid. B: 1: PCR analyzer; 2: Water bath pot; 3: Metal bath.

杀性巴氏杆菌(*P. multocida*)、溶血曼氏杆菌(*M. haemolytica*)、大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、产单核细胞李斯特菌(*L. monocytogenes*)、牛病毒性黏膜病/腹泻病病毒(BVDV)、牛疱疹病毒(BHV)、无乳支原体(*M. agalactiae*)、精氨酸支原体(*M. arginini*)核酸进行检测。结果表明,仅牛支原体显示阳性,而其他牛病原体均无交叉反应(图 4A 和 4B),表明该方法具有良好的特异性。

## 2.5 敏感性结果

将  $172.8 \text{ ng}/\mu\text{L}$  的牛支原体基因组进行 10 倍梯度稀释,同时运用 LAMP-LFD 方法和常规 PCR 方法进行检测。结果如图 5A 所示,常规 PCR 方法最低可检测到  $1.728 \times 10^{-2} \text{ ng}/\mu\text{L}$ ; 而

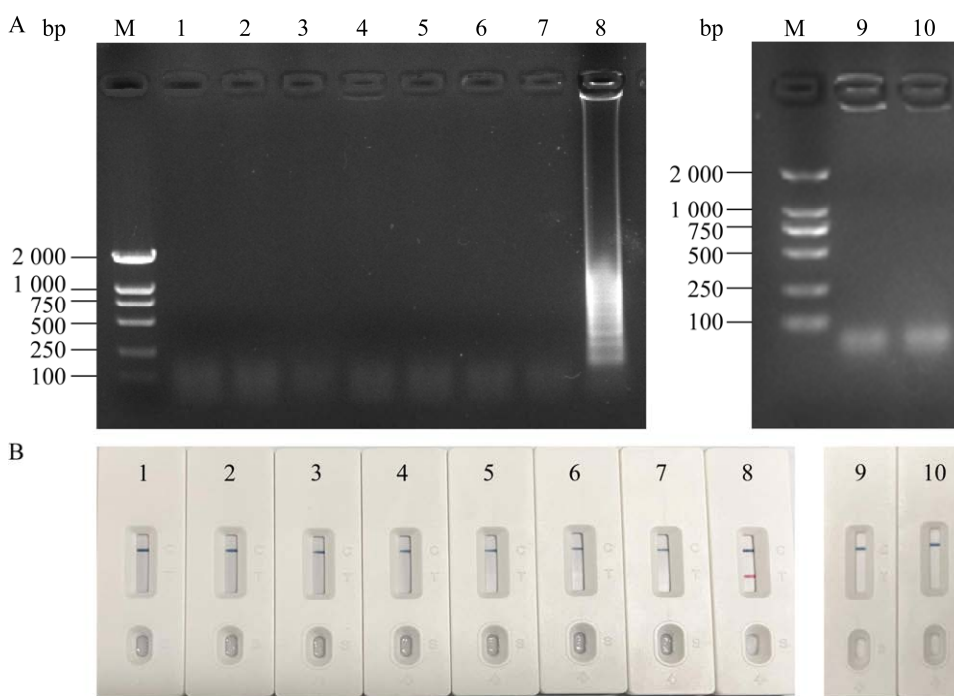
LAMP-LFD 方法最低可达检测  $1.728 \times 10^{-5} \text{ ng}/\mu\text{L}$  (图 5B 和 5C 所示),比常规 PCR 法灵敏 1 000 倍,表明该方法敏感性较高。

## 2.6 重复性结果

制备 3 批诊断试剂分别进行批间与批内试验。结果显示,批间与批内试验均一致,表明该方法重复性好(表 2)。

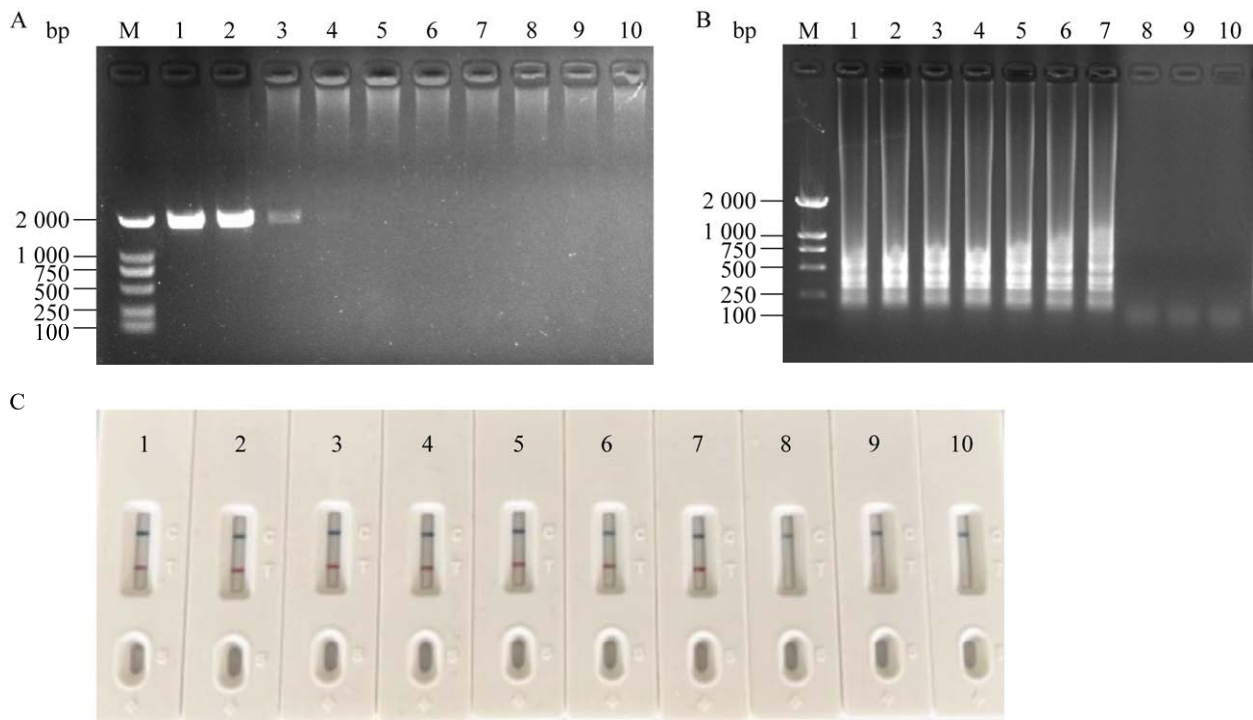
## 2.7 临床样本检测结果

对 39 份牦牛鼻拭子临床样品提取基因组,利用行业标准推荐的普通 PCR 法和本研究建立的 LAMP-LFD 可视化同时进行检测。结果如表 3 所示,普通 PCR 法检出率为 23.07% (9/39); LAMP-LFD 法检出率为 28.21% (11/39),其中 LAMP-LFD 方法均能检出 PCR 检出的 9 份



**图 4 LAMP-LFD 特异性检测** A: LAMP 琼脂糖凝胶电泳图. B: LAMP-LFD 结果. M: DL2000 DNA 分子质量标准; 1: 多杀性巴氏杆菌; 2: 溶血性曼氏杆菌; 3: 大肠杆菌; 4: 牛病毒性黏膜病/腹泻病病毒; 5: 牛疱疹病毒; 6: 金黄色葡萄球菌; 7: 产单核细胞李斯特菌; 8: 牛支原体; 9: 无乳支原体; 10: 精氨酸支原体

Figure 4 LAMP-LFD specific detection. A: LAMP agarose gel electrophoresis map. B: LAMP-LFD results. M: DL2000 DNA Marker; 1: *P. multocida*; 2: *M. haemolytica*; 3: *E. coli*; 4: BVDV; 5: BHV; 6: *S. aureus*; 7: *L. monocytogenes*; 8: *M. bovis*; 9: *M. agalactiae*; 10: *M. arginini*.



**图 5 PCR 检测与 LAMP-LFD 检测敏感性比较** A: PCR 敏感性琼脂糖凝胶电泳图. B: LAMP 敏感性琼脂糖凝胶电泳图. C: LAMP-LFD 结果. M: DL2000 DNA Marker; 1-9: DNA 稀释浓度分别为 17.28、1.728、 $1.728 \times 10^{-1}$ 、 $1.728 \times 10^{-2}$ 、 $1.728 \times 10^{-3}$ 、 $1.728 \times 10^{-4}$ 、 $1.728 \times 10^{-5}$ 、 $1.728 \times 10^{-6}$ 、 $1.728 \times 10^{-7}$  ng/ $\mu$ L; 10: 阴性对照

Figure 5 Sensitivity comparison between PCR and LAMP-LFD. A: PCR sensitivity agarose gel electrophoresis. B: LAMP sensitivity agarose gel electrophoresis map. C: LAMP-LFD results. M: DL2000 DNA Marker; 1-9: DNA dilution concentrations were 17.28, 1.728,  $1.728 \times 10^{-1}$ ,  $1.728 \times 10^{-2}$ ,  $1.728 \times 10^{-3}$ ,  $1.728 \times 10^{-4}$ ,  $1.728 \times 10^{-5}$ ,  $1.728 \times 10^{-6}$ ,  $1.728 \times 10^{-7}$  ng/ $\mu$ L; 10: Negative control.

**表 2 LAMP-LFD 重复性检测结果**

Table 2 LAMP-LFD repeatability test results

批次号码 Batch number	牛支原体核酸 <i>M. bovis</i> nucleic acid	双蒸水 ddH <sub>2</sub> O
20231110	+	-
	+	-
	+	-
20231125	+	-
	+	-
	+	-
20231210	+	-
	+	-
	+	-

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

**表 3 39 份牦牛鼻拭子样品检测结果**

Table 3 Detection results of 39 clinical samples of yak nasal swabs

Item	检测方法 Detection method	
	LAMP-LFD	PCR
阳性数量 Positive number	11	9
阴性数量 Negative number	28	30
阳性率 Positive rate (%)	28.21	23.07

阳性样品, 检出率高于行业标准推荐的普通 PCR 方法<sup>[16]</sup>。表明本研究所建立的 LAMP-LFD 方法适用于临床检测。



### 3 讨论

牛支原体呈世界范围内流行, 每年给养牛业造成巨大的经济损失。据报道, 牛支原体在国外阳性率为 64.4%–88.0%<sup>[17-18]</sup>, 国内阳性率为 8.7%–48.7%<sup>[19-20]</sup>。目前牛支原体核酸检测方法主要有常规 PCR、荧光定量 PCR、LAMP 等<sup>[21-22]</sup>。常规 PCR、荧光定量 PCR 方法虽然具有灵敏度高、特异性强等优点, 但需昂贵仪器和专业人员, 不利于临床现场使用<sup>[21,23]</sup>。而已有 LAMP 方法主要与凝胶电泳、比浊法、荧光染料相结合, 这些方法除需专业仪器外<sup>[14-15,23]</sup>。在实验中产生的非特异性扩增如引物二聚体会干扰观察结果<sup>[24]</sup>。实验中, 产生的引物二聚体会导致反应体系浑浊; 若加入荧光染料非特异性扩增也会导致假阳性。LFD 操作便捷、能现场观察结果, 且以检测靶标基因的观察方法可有效减少非特异性扩增及引物二聚体扩增问题<sup>[25]</sup>。因此, 本研究将 LAMP 方法与 LFD 结合建立了更加灵敏、特异且直观的检测方法。

在靶基因选择方面, 牛支原体特异性靶基因有 *oppD/F*、*urvC* 等。其中 *oppD/F* 包含 *oppD* 基因和 *oppF* 基因, 并且两个基因均为编码寡肽转运 ATP 结合蛋白基因。但 Appelt 等<sup>[14]</sup> 研究报告, *oppD* 基因优于 *oppF* 基因。因此, 本研究利用荧光染料法以 *P48* 基因为目标基因设计 LAMP 引物与已报道的以 *oppD/F*<sup>[13]</sup>、*oppD*<sup>[14]</sup>、*urvC*<sup>[15]</sup> 特异性基因设计的 LAMP 引物进行了比较, 结果显示本研究所设计的 *P48* LAMP 引物组荧光信号更强,  $C_t$  值较小, 扩增效率较高, 优于已报道的引物。

敏感性和特异性是评价该方法的重要指标<sup>[26]</sup>。该方法与牛常见病原体(多杀性巴氏杆菌、溶血性曼氏杆菌等 9 种)均无交叉反应, 表明该方法特异性较好。虽已有报道以 *P48* 基因为靶标能

特异区分牛支原体与丝状支原体<sup>[12]</sup>, 但由于丝状支原体引起的牛肺疫已在我国消灭, 无法获取病原核酸, 未能进一步验证该方法与引起临床症状相似的丝状支原体(肺炎)<sup>[27]</sup>病原是否存在交叉反应。因此, 本研究对引物组、扩增产物进行 BLAST 比较, 结果显示引物组只能扩增牛支原体, 并且扩增产物均为牛支原体 *P48* 基因。将扩增产物与无乳支原体 *P48* 基因比较, 其差异率达 23%, 相较 *P48* 基因全长特异性更高(差异率为 19%)。另一方面, 在临床样品检测中, LAMP-LFD 检出率为 28.21%, 高于普通 PCR 方法的检测(23.07%), 并且 PCR 检出的阳性样本 LAMP-LFD 方法均能检出。鼻拭子是临床采样中最简易的方法, 但从中提取的核酸可能含量较低, 所以要求建立的检测方法需较高的敏感性。而本研究以牛支原体 *P48* 基因建立的 LAMP-LFD 检测方法, 最低检测限为 17.28 fg/ $\mu$ L, 是常规 PCR 方法的 1 000 倍。这与侯轩等(20 pg/ $\mu$ L)<sup>[28]</sup>、范晴等(100 copies/ $\mu$ L)<sup>[29]</sup>建立的 LAMP 检测方法的敏感性相当或更高。

### 4 结论

本研究成功建立了灵敏、特异、操作便捷、更适用于基层的牛支原体 LAMP-LFD 方法, 可为牛支原体防控、流行病学调查等提供技术支持。

### REFERENCES

- [1] GELGIE AE, DESAI SE, GELALCHA BD, DEGO OK. *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy cattle[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2024, 11: 1322267.
- [2] 李月, 朱来萍, 陶松, 詹建举, 余桃樱, 岩锐, 郑碧姐, 高林, 谢佳芮, 王生奎, 杨仕标, 姚俊. 牛腺病毒 7 型、牛支原体和细菌混合感染致外购肉牛呼吸系统疾病的确诊[J]. *中国兽医杂志*, 2021, 57(9): 71-78. LI Y, ZHU LP, TAO S, ZHAN JJ, YU TY, YAN R, ZHENG BN, GAO L, XIE JR, WANG SK, YANG SB,

- YAO J. Diagnosis of respiratory diseases in outsourced beef cattle due to mixed infection of bovine adenovirus type 7, *Mycoplasma bovis* and bacteria[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2021, 57(9): 71-78 (in Chinese).
- [3] DAS D, LIN CW, CHUANG HS. LAMP-based point-of-care biosensors for rapid pathogen detection[J]. Biosensors, 2022, 12(12): 1068.
- [4] LI YL, LIN F, SUN LH, HUANG AX, CHEN JM, HAO GJ, YUAN XM, ZHANG HQ, SU SQ. Detection of cyprinid herpesvirus 2 by loop-mediated isothermal amplification in combination with a lateral flow dipstick[J]. Molecular and Cellular Probes, 2020, 50: 101507.
- [5] MU JM, LI Q, YAN X, MAO XW, SHI YQ, QIN Y, LIU CX, WANG WL. Detection of *Brucella* S2 vaccine strain by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 1023243.
- [6] 郑如雯, 黄涛, 吴道义, 禹光美, 李芳芳, 隋鑫, 闵婷玉. 牛病毒性腹泻病毒 LAMP-LFD 检测方法的建立及初步应用[J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(11): 4745-4753.
- ZHENG RW, HUANG T, WU DY, YU GM, LI FF, SUI X, MIN TY. Establishment and preliminary application of LAMP-LFD detection method for bovine viral diarrhea virus[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2023, 54(11): 4745-4753 (in Chinese).
- [7] ARNUPHAPPASERT A, NUGRAHANI YR, AUNG A, ASADA M, KAEWTHAMASORN M. Detection of *Babesia bovis* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with improved thermostability, sensitivity and alternative visualization methods[J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 1838.
- [8] LI RW, WANG JF, SUN XX, LIU LB, WANG JC, YUAN WZ. Direct and rapid detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk samples by recombinase polymerase amplification assays[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 639083.
- [9] MAYA-RODRÍGUEZ LM, CARRILLO-CASAS EM, ROJAS-TREJO V, TRIGO-TAVERA F, MIRANDA-MORALES RE. Prevalence of three *Mycoplasma* sp. by multiplex PCR in cattle with and without respiratory disease in central Mexico[J]. Tropical Animal Health and Production, 2022, 54(6): 394.
- [10] BECKER CAM, AMBROSET C, HULEUX A, VIALATTE A, COLIN A, TRICOT A, ARCANGIOLI MA, TARDY F. Monitoring *Mycoplasma bovis* diversity and antimicrobial susceptibility in calf feedlots undergoing a respiratory disease outbreak[J]. Pathogens, 2020, 9(7): 593.
- [11] ROBINO P, ALBERTI A, PITTAU M, CHESSA B, MICILETTA M, NEBBIA P, Le GRAND D, ROSATI S. Genetic and antigenic characterization of the surface lipoprotein P48 of *Mycoplasma bovis*[J]. Veterinary Microbiology, 2005, 109(3/4): 201-209.
- [12] 包世俊, 胡国明, 张阳阳, 邢小勇, 温峰琴, 武小椿. 牛支原体肺炎 PCR 诊断方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医科学, 2020, 50(5): 550-555.
- BAO SJ, HU GM, ZHANG YY, XING XY, WEN FQ, WU XC. Establishment and preliminary application of PCR diagnostic method for *Mycoplasma bovis* pneumonia[J]. Chinese Veterinary Science, 2020, 50(5): 550-555 (in Chinese).
- [13] HIGA Y, UEMURA R, YAMAZAKI W, GOTO S, GOTO Y, SUEYOSHI M. An improved loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Mycoplasma bovis*[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2016, 78(8): 1343-1346.
- [14] APPELT S, ALY SS, TONOOKA K, GLENN K, XUE ZY, LEHENBAUER TW, MARCO ML. Development and comparison of loop-mediated isothermal amplification and quantitative polymerase chain reaction assays for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(3): 1985-1996.
- [15] ASHRAF A, IMRAN M, YAQUB T, TAYYAB M, SHEHZAD W, MINGALA CN, CHANG YF. Development and validation of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Mycoplasma bovis* in mastitic milk[J]. Folia Microbiologica, 2018, 63(3): 373-380.
- [16] 农业农村部. 牛支原体 PCR 检测方法 NY/T 3234—2018[S]. 20180901. Ministry of Agriculture and Rural Affairs. *Mycoplasma bovis* PCR detection method NY/T 3234—2018[S]. 20180901 (in Chinese).
- [17] KUDIRKIENE E, AAGAARD AK, SCHMIDT LMB, PANSRI P, KROGH KM, OLSEN JE. Occurrence of major and minor pathogens in calves diagnosed with bovine respiratory disease[J]. Veterinary Microbiology, 2021, 259: 109135.
- [18] DUDEK K, NICHOLAS RAJ, SZACAWA E, BEDNAREK D. *Mycoplasma bovis* infections-occurrence, diagnosis and control[J]. Pathogens, 2020, 9(8): 640.
- [19] NIU JQ, LI K, PAN HC, GAO X, LI JK, WANG DJ,

- YAN MS, XU YF, SIZHU SL. Epidemiological survey of *Mycoplasma bovis* in yaks on the Qinghai Tibetan Plateau, China[J]. BioMed Research International, 2021, 2021: 6646664.
- [20] LIU Y, XU SY, LI MY, ZHOU M, HUO WL, GAO J, LIU G, KASTELIC JP, HAN B. Molecular characteristics and antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* associated with mastitis on dairy farms in China[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2020, 182: 105106.
- [21] AEBI M, van den BORNE BHP, RAEMY A, STEINER A, PILO P, BODMER M. *Mycoplasma bovis* infections in Swiss dairy cattle: a clinical investigation[J]. Acta Veterinaria Scandinavica, 2015, 57(1): 10.
- [22] FAN Q, XIE ZX, XIE ZQ, XIE LJ, HUANG JL, ZHANG YF, ZENG TT, ZHANG MX, WAN S, LUO SS, LIU JB, DENG XW. Development of duplex fluorescence-based loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Mycoplasma bovis* and bovine herpes virus 1[J]. Journal of Virological Methods, 2018, 261: 132-138.
- [23] HASHEM YM, MOUSA WS, ABDEEN EE, ABDELKHALEK HM, NOORUZZAMAN M, EL-ASKARY A, ISMAIL KA, MEGAHED AM, ABDEEN A, SOLIMAN EA, WARETH G. Prevalence and molecular characterization of *Mycoplasma* species, *Pasteurella multocida*, and *Staphylococcus aureus* isolated from calves with respiratory manifestations[J]. Animals, 2022, 12(3): 312.
- [24] LI YM, FAN PH, ZHOU SS, ZHANG L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a novel rapid detection platform for pathogens[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 107: 54-61.
- [25] JAROENRAM W, KAMPEERA J, ARUNRUT N, SIRITHAMMAJAK S, JAITRONG S, BOONNAK K, KHUMWAN P, PRAMMANANAN T, CHAI PRASERT A, KIATPATHOMCHAI W. Ultrasensitive detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a rapid and specific probe-triggered one-step, simultaneous DNA hybridization and isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 16976.
- [26] OKELLA H, TONOOKA K, OKELLO E. A systematic review of the recent techniques commonly used in the diagnosis of *Mycoplasma bovis* in dairy cattle[J]. Pathogens, 2023, 12(9): 1178.
- [27] DUDEK K, SZACAWA E, NICHOLAS RAJ. Recent developments in vaccines for bovine mycoplasmoses caused by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*[J]. Vaccines, 2021, 9(6): 549.
- [28] 侯轩, 付萍, 张海燕, 张跃伟, 吴文学. 牛支原体的环介导等温扩增快速检测技术研究[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(2): 218-224.
- HOU X, FU P, ZHANG HY, ZHANG YW, WU WX. Development of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Mycoplasma bovis*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2012, 20(2): 218-224 (in Chinese).
- [29] 范晴, 谢芝勋, 谢志勤, 谢丽基, 黄娇玲, 张艳芳, 曾婷婷, 王盛, 罗思思, 邓显文, 刘加波. 可视化牛支原体和传染性鼻气管炎二重荧光 LAMP 诊断方法的建立[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(1): 448-456.
- FAN Q, XIE ZX, XIE ZQ, XIE LJ, HUANG JL, ZHANG YF, ZENG TT, WANG S, LUO SS, DENG XW, LIU JB. Establishment of a visual duplex fluorescence-based LAMP method for the diagnosis of *Mycoplasma bovis* and infectious rhinotracheitis[J]. Genomics and Applied Biology, 2021, 40(1): 448-456 (in Chinese).