

# 牛支原体检测技术的研究进展

纪贝贝<sup>1</sup>，包蓓蓓<sup>2\*</sup>，蔡凯峰<sup>3</sup>

(1.青岛市市级公园管理服务中心，山东青岛 266000；2.信阳市农业综合行政执法支队，河南信阳 464000；3.中国动物卫生与流行病学中心，山东青岛 266032)

**摘要：**奶牛乳腺炎是制约奶业健康发展的重要疾病，其中牛支原体作为关键病原体，具有传染性强、致病性高、缺乏有效治疗手段等特点，其快速准确检测对防控具有重要意义。本文系统综述了牛支原体检测技术的研究进展，主要包括传统微生物分离培养法、血清学检测方法以及基于DNA的分子检测技术。本文分析了各类方法的优缺点，指出分子检测技术尤其是qPCR在灵敏度与特异性方面优势显著，而RPA、LAMP等新兴等温扩增技术因操作简便、快速、设备依赖低，展现出良好的现场应用潜力，以期奶牛乳腺炎的早期诊断与综合防控提供理论支持与技术参考。

**关键词：**奶牛乳腺炎；牛支原体；微生物分离培养；血清学检测；DNA技术

文章编号：1671-4393（2026）04-0049-08

DOI:10.12377/1671-4393.26.04.09

## Research Progress in Detection Techniques for Mycoplasma bovis

Ji Beibei<sup>1</sup>，BAO Beibei<sup>2\*</sup>，CAI Kaifeng<sup>3</sup>

(1.Qingdao Municipal Park Management Service Center, Qingdao Shandong 266000; 2.Xinyang Agricultural Comprehensive Administrative Law Enforcement Detachment, Xinyang Henan 464000; 3.China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao Shandong 266032)

**Abstract:** Bovine mastitis is a major disease constraining the healthy development of the dairy industry. Mycoplasma bovis, as one of its key pathogens, is characterized by high contagiousity, strong pathogenicity, and a lack of effective treatments, making its rapid and accurate detection crucial for prevention and control. This paper systematically reviewed the research progress in detection techniques for Mycoplasma bovis, primarily including traditional microbial isolation and culture, serological testing, and DNA-based molecular detection technologies. The advantages and limitations of various methods were analyzed. It is highlighted that molecular detection

**基金项目：**中国动物卫生与流行病学中心创新基金项目（2025081900）

**作者简介：**纪贝贝（1987-），女，山东青岛人，本科，高级兽医师，研究方向为动物检疫及动物医学；

蔡凯峰（1987-），男，山东青岛人，本科，助理研究员，研究方向为综合管理与动物疫病防控政策。

**通信作者：**包蓓蓓（1979-），女，河南信阳人，专科，助理畜牧师，研究方向为执法监管及动物诊疗的监督管理。

technologies—especially qPCR—demonstrate significant superiority in sensitivity and specificity, while emerging isothermal amplification technologies such as RPA and LAMP show great potential for field application due to their simplicity, rapidity, and low equipment dependency. This review aimed to provide theoretical support and technical references for the early diagnosis and integrated prevention and control of bovine mastitis.

**Keywords:** bovine mastitis; mycoplasma bovis; microbial isolation and culture; serological detection; DNA technology

奶牛乳腺炎是一种主要由病原微生物感染乳腺组织而引起的疾病，在奶牛场中越来越普遍，每年都给生产者带来巨大的经济损失。在引起牛乳腺炎的4种常见的支原体中（牛支原体、加拿大支原体、加利福尼亚支原体和牛生殖道支原体），牛支原体是最常见的病原体<sup>[1]</sup>。除了乳腺炎外，牛支原体还会引发中耳炎、生殖系统疾病和流产、牛呼吸系统疾病、角膜结膜炎以及关节炎。该病原于1961年由美国学者Hale首次分离。2008年，中国首次从疑似肺炎病牛的肺部分离出牛支原体，此后该病在我国部分地区持续发生<sup>[2]</sup>。温靖等<sup>[3]</sup>于2013—2019年，在中国6个集约化牧场，通过随机采样收集犊牛鼻拭子1 878份，采用细菌分离培养和PCR方法检测牛支原体，结果发现，牛支原体阳性率平均值为32.6%，表明牛支原体在我国呈长期流行趋势。2003年，在美国，由牛支原体引起的乳腺炎每年造成的损失高达1.08亿美元，牛群感染率高达70%<sup>[4]</sup>。

目前，鉴于牛乳腺炎缺乏有效的治疗手段，对该病的控制完全依赖于早期识别、隔离和淘汰。然而，牛支原体感染的牛只所表现出的临床症状和病理变化并不具有特异性，这使其诊断变得复杂。因此，为了控制潜在的疫情暴发，需要快速、灵敏且准确的动物检测方法。由牛支原体引起的感染可通过传统微生物分离培养法、血清学检测和分子生物学方法进行诊断。本文系统综述了近年来用于牛支原体检测的技术方法，包括其优势、准确性和局限性，旨在为未来诊断技术的发展提供参考依据。

### 1 微生物分离培养

传统上，牛支原体的鉴定主要通过微生物分离培养法。支原体结构简单，无法自身合成氨基酸，且不能完全或部分合成脂肪酸，其生存高度依靠外源性供给，生长和培养条件苛刻<sup>[5]</sup>。为满足其高营养需求，培养牛支原体需使用特异性培养基，通常富含血清、牛心浸出液、蛋白胨及酵母提取物等，最适pH值7.6~8.0。牛支原体为兼性厌氧菌，在37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养7~10 d。培养过程中，其他生长更快的细菌可能过度繁殖，从而影响支原体的分离，因此常在培养基中添加乙酸铀或抗生素等抗菌剂。光学显微镜下牛支原体菌落呈现“煎蛋”状形态。牛支原体为革兰氏阳性，但因无细胞壁，革兰氏染色困难，吡啶橙染色效果更佳，染色后菌体呈亮红色或橘红色<sup>[6]</sup>。

虽然分离微生物培养法操作相对简便、成本较低，成为传统的鉴定手段，但其确实存在若干局限性。由于支原体无法在乳汁中增殖<sup>[7]</sup>，因此样本中可能存在的其他微生物（作为污染物或混合感染的一部分）很容易过度生长，从而掩盖支原体，导致假阴性结果。为防止或尽量减少样本中其他微生物的过度生长，并使支原体在特异性培养基上的存活与生长最大化，样本采集、处理和保存是关键环节，对成功分离鉴定至关重要。

样本应无菌采集至无菌试管或容器中，然后置于4℃保存，并尽快运送至实验室进行培养。如果不能在2 d内进行培养，应将样本冷冻。冷冻样本可

能导致牛支原体的菌落形成回收率下降1~2个对数级。这种回收率的损失对于个别临床样本（可能含有较高浓度的微生物）与混合样本或生乳样本（可能微生物浓度较低）的影响有所不同。理想情况下，冷冻样本应在室温下解冻以确保最大回收率，而反复冻融将进一步降低活菌数量。无论样本是冷藏还是冷冻，随着送检前存放时间延长，支原体的回收率都会下降；当新鲜样本在采集后几小时内接种到培养基并进行培养时，可获得最佳回收率。如果样本未得到适当采集和保存，可能会报告出假阴性的培养结果<sup>[8]</sup>。

要通过微生物分离培养法诊断牛支原体感染，奶牛在采样时必须正在排出活的病原体。据报道，在慢性或亚临床型支原体乳腺炎病例中，常出现间歇性排菌现象，这可能导致单次采样无法确诊。在一项研究中，对10头慢性感染动物连续28 d每日采样，从71%的混合乳样中分离出了支原体<sup>[9]</sup>。Gonzalez等<sup>[10]</sup>报道一头慢性感染牛在长达56 d的时间内未排出牛支原体。在混合乳样本中，通过一次培养识别出感染牛群的概率估计为33%。因此，为了提高在慢性或亚临床型乳腺炎病例以及混合乳样本中检测到支原体的可能性，应在多天内采集多个样本。对于混合乳样本的采样建议指出，应至少间隔3~4 d采集3份样本进行培养。总体而言，微生物培养技术在诊断中的有效性和效率受到一些限制，这些限制包括耗时、现场适用性以及准确性等方面。

## 2 血清学检测

### 2.1 酶联免疫吸附试验

这是目前用于检测牛支原体特异性抗体最常用的血清学技术。酶联免疫吸附试验技术可用于临床上病牛中牛支原体抗体或抗原的筛查。目前牛支原体血清学检测研发的主要方向为采用重组蛋白为包被抗原建立间接ELISA方法。李祥慧等<sup>[11]</sup>利用PCR扩增牛支原体MbovP730基因后，采用原核表达方式获得重组蛋白rMbovP730，利用牛支原体阳性血清经western blot鉴定其反应原性；以该重组蛋白为包

被抗原，采用棋盘法对各反应条件优化后建立牛支原体抗体的间接ELISA检测方法，结果表明，基于rMbovP730建立的间接ELISA方法特异性强、敏感性高、重复性好。P48蛋白是一种位于牛支原体表面的具有免疫原性的保守蛋白，含有主要的抗原决定簇，可刺激家兔产生特异性抗体，具有良好的免疫原性。张妍等<sup>[12]</sup>采用原核表达的重组P48蛋白作为包被抗原，建立了家兔牛支原体的间接酶联免疫吸附试验抗体检测方法。该方法可用于牛支原体诊断早期和抗体水平检测，具有良好的敏感性、特异性和稳定性。由于整个ELISA流程耗时较短，且可在常规诊断实验室完成，因此非常适合大规模样本筛查，用于疫情流行病学和风险监测。迄今为止，市面上已有各种商业化的ELISA试剂盒，包括Bio X、CHECK-IT M. bovis-Sero、IDEXX、Biovet以及MilA等，其中Bio X牛支原体ELISA试剂盒是使用最为广泛的一种。尽管ELISA技术通常比培养方法更省力、更省时，但血清转化可能需要2~3周才能检测到抗体，这可能导致假阴性结果。此外，由于与其他亲缘关系较近的生物体发生交叉反应而产生的不确定性，会降低ELISA的特异性，因此需要采用互补技术以实现准确诊断<sup>[13]</sup>。另外，存在抗牛支原体抗体并不意味着该奶牛当前感染了病原体或正在排出活的病原体。抗体存在可能表明感染发生在乳腺以外的其他部位，也可能是母源抗体或天然抗体的结果。因此，建议在利用酶联免疫吸附试验结果进行大罐奶检测时，应结合基于DNA的技术一起使用。虽然大罐采样可能减少假阳性情况，但会使测试的灵敏度下降约43.5%，从而难以解读检测结果。不过，该方法仍可用于监测牛群健康状况<sup>[14]</sup>。

### 2.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）与蛋白质印迹法（Western Blotting）

通过SDS-PAGE和Western Blotting进行全细胞蛋白质分析，被广泛用于表征单个细菌菌株（包括支原体分离株）的抗原谱。该程序具有高度特异性，能够区分同一物种内的不同群体。利用SDS-PAGE和Western Blotting，可以比较支原体菌株的抗原结

构，还可以揭示宿主动物的体液免疫应答模式。该技术最初用于鉴定34株具有高度相似性的牛支原体分离株<sup>[15]</sup>。随后，通过在SDS-PAGE上对蛋白进行分离，鉴定出潜在的牛支原体抗原蛋白。同样采用该技术，根据凝胶上天然蛋白条带模式的差异，成功区分了牛支原体与无乳支原体。研究发现，在无乳支原体和牛支原体中分别存在7种主要的免疫交叉反应蛋白，以及两种重要的非交叉反应种特异性多肽<sup>[16]</sup>。该结果再次证实了早期研究观点，即Western Blotting能够克服如ELISA等方法存在的交叉反应性缺陷。

2.3 免疫结合试验

免疫结合试验是用于诊断牛支原体的早期技术之一。该检测方法最早由Infante Martinez等<sup>[17]</sup>应用于检测乳汁中的支原体种类。研究发现，当使用单克隆抗体时，该检测方法具有高度特异性。后来，该检测方法得到改进，在最高灵敏度和特异性的条件下，仅需110 min即可检测出自然感染乳汁中42.3%的牛支原体<sup>[18]</sup>。随着该检测方法进一步发展，采用硝酸纤维素纸并结合单克隆抗体，被用于检测人工感染小母牛生殖道拭子及牛支原体培养分离株。研究人员在硝酸纤维素纸上开发了一种基于单克隆抗体的免疫结合试验，用于诊断人工感染小母牛生殖道培养分离物中的牛支原体，并以聚合酶链式反应作为金标准。该免疫结合试验的灵敏度为 $5 \times 10^3$  CFU/mL，且具有高度特异性，未与其他支原体或无胆甾原体菌株发生交叉反应。其灵敏度为96.43%，特异性和阳性预测值均为100.00%，阴性预测值达100.00%。免疫结合试验与PCR检测的诊断效度值无显著差异<sup>[19]</sup>。

2.4 胶体金免疫层析技术（GICA）

GICA是一种集胶体金标记、免疫检测和层析分析于一体的固相标记免疫检测技术。该技术利用胶体金颗粒作为标记物，通过抗原-抗体反应实现检测。当样本中的目标抗原与胶体金标记的抗体结合后，在层析膜上形成可见的红色线条，从而判断样本中是否含有目标物质。田可昕<sup>[20]</sup>利用牛支原体P300蛋白构建了牛支原体重组蛋白胶体金免疫层析

试验方法，与ELISA试剂盒对比符合率为94.04%，该试纸条制备效果良好。周华倩<sup>[21]</sup>研究发现，P80和P48与高免牛支原体血清具有较好的反应原性，所表达的蛋白的纯度和浓度为90%以上，基于牛支原体P48和P80蛋白，建立用于现场快速检测牛支原体抗体的免疫胶体金层析试纸条，与商品化试剂盒检测结果比较，结果显示阳性符合率分别为100%和90.12%，阴性符合率分别为89.61%和98.36%，研制的试纸条可现场快速检测牛支原体抗体。尽管胶体金免疫层析技术具有诸多优点，但也存在一些不足之处。例如，该技术易出现假阳性结果，可能与溶血样本或自身抗体干扰有关；定量检测方面相对较弱。

3 基于DNA的检测技术

3.1 常规聚合酶链式反应（PCR）

常规PCR利用序列特异性寡核苷酸引物和耐热聚合酶，在体外对特定的DNA靶标进行扩增。已报道的牛支原体DNA靶标包括uvrC、16S rRNA、gyrB、polC、16S-23S rRNA ITS、oppD、vspB和gltX等<sup>[22]</sup>。多重PCR（Multiplex PCR）可同时扩增多个靶基因，提高检测效率和特异性，已在牛支原体检测中应用。通过优化引物组合，多重PCR能在单一反应中鉴别牛支原体与其他支原体种，减少样本消耗与操作时间。然而，其建立需大量前期优化，引物间易发生非特异性相互作用，影响稳定性。此外，扩增片段长度相近时难以区分，限制了其广泛应用。为了进一步提高常规PCR的灵敏度和特异性，巢式PCR（Nested PCR）应运而生。与多重PCR不同，巢式PCR在连续两轮PCR反应中使用两对不同的扩增引物。在美国爱荷华州农场采集的现场乳汁样本研究中，Pinnow等<sup>[23]</sup>利用巢式PCR，在53份乳汁样本中检测到49.1%的牛支原体基因，其检测方法灵敏度达到5.1 CFU/mL。

3.2 实时荧光定量PCR（Real-time PCR）

实时荧光定量PCR基于不同荧光标记的DNA探针针对扩增产物进行定量检测。与传统PCR相比，

它具有更快速、更灵敏的优势，并且无需反应后处理。在乳房炎检测中，实时荧光定量PCR的灵敏度和特异性可达100%<sup>[24]</sup>。目前市面上已有数款用于检测牛支原体的商业化qPCR试剂盒。赛默飞世尔科技公司推出的PathoProof™ Mastitis Major-3试剂盒，就是其中之一，该试剂盒能够同时检测牛支原体以及另外两种传染性乳房炎病原体（金黄色葡萄球菌和无乳链球菌）。凯杰公司的bacto-type Mastitis HP3 PCR试剂盒则是另一款高灵敏度、高特异性的检测产品，可用于鉴别和区分奶样（乳区奶样、混合样或大罐奶）中3种主要致乳房炎病原体（牛支原体、无乳链球菌和金黄色葡萄球菌）的DNA。其他商业化试剂盒还包括VetMAX™ MastiType Myco8试剂盒（英国沃灵顿赛默飞世尔公司）和Mastit4试剂盒（丹麦里索夫DNA诊断公司）。

多项研究报道，利用实时荧光定量PCR技术已在全球范围内成功且精准地诊断出牛支原体乳腺炎。肖静<sup>[25]</sup>在牛支原体基因组的IS30多拷贝靶标序列保守区设计引物，以牛支原体DNA和活菌为检测模板，比较IS30多拷贝靶标与国际通用靶标及OPP D/F靶标的灵敏度。通过优化实时荧光定量PCR反应参数，建立基于SYBR Green I的牛支原体实时荧光定量PCR检测方法。李建等<sup>[26]</sup>根据牛支原体OPP D/F基因序列设计特异性引物与TaqMan探针，以重组质粒作为绝对定量模板，构建检测牛支原体的TaqMan实时荧光定量PCR检测方法。翟肖辉等<sup>[27]</sup>以牛支原体P80基因为靶基因，设计特异性引物与探针，优化反应体系，建立了牛支原体TaqMan探针实时荧光定量PCR检测方法。并对该方法进行了特异性、敏感性、重复性评估以及临床样本检测，可用于牛支原体的快速诊断和核酸定量检测。Chauhan等<sup>[28]</sup>开发了一种多重qPCR方法，可同时检测牛支原体、莱氏无胆甾原体（*A. laidlawii*）以及几种支原体，如加州支原体（*M. Californicum*）、牛生殖支原体（*M. Bovigenitalium*）、加拿大支原体（*M. Canadense*）、精氨酸支原体（*M. Arginini*）和产碱支原体（*M. Alkalescens*）。该检测方法以支原

体的16S rRNA基因、牛支原体的rpoB基因以及莱氏无胆甾原体的16S-23S rRNA基因间区（ITS）为靶标，能够从美国加利福尼亚州奶牛场采集的乳样中检测并区分牛支原体与其他常见支原体种类，以及非致病性的莱氏无胆甾原体。然而，该检测所涉及的样本制备步骤使用了QIAGEN DNeasy Blood and Tissue裂解试剂盒，这可能会大幅增加检测成本。

### 3.3 重组酶聚合酶扩增技术（RPA）

2006年英国开发出RPA，为核酸提供了一种等温扩增方法。该技术通过一系列酶反应实现双链DNA扩增，无需热变性或化学变性处理。此外，RPA结果可通过侧流层析试纸条（LFD）直观显示，特别适合在资源匮乏地区或野外环境进行检测。RPA-LFD技术摆脱了对精密热循环仪器的依赖，在保持高灵敏度的同时大幅提升检测效率，可实现检测结果的快速可视化判读<sup>[29]</sup>。该方法为目前缺乏的稳健有效检测技术的开发指明了方向。Rossetti等<sup>[30]</sup>开发了靶向UvrC基因（UvrC基因是牛支原体的一种管家基因，该基因已被推荐用于牛支原体的常规实验室诊断，并在大宗奶罐和肺部样本检测中广泛作为常规PCR与实时PCR的靶标）的实时PCR检测法，可直接从牛奶和组织样本中检测牛分枝杆菌，且干扰显著降低。重组酶聚合酶扩增（RPA）技术作为一种简单而稳健的等温DNA扩增方法，因其外部干扰较小，有望成为适用于现场快速检测的另一项技术。Li等<sup>[31]</sup>针对牛支原体的UvrC基因，建立了基于荧光监测的实时RPA检测法和结合侧流层析试纸条的RPA检测法（LFS RPA）。实时RPA在39℃的条件下仅需20 min即可完成，而LFS RPA在39℃恒温孵育块中反应15 min后，即可通过侧流层析试纸条可视化读取结果。两种检测方法均对牛支原体具有高度特异性，与其他测试病原体无交叉反应。以标准重组质粒pMbovis-UvrC为模板时，两种RPA检测方法的灵敏度均达到每个反应10 拷贝/μL，与实时PCR检测相当。在65份乳腺炎患牛乳样检测中，实时RPA和LFS RPA均检出24份样本含有牛支原体基因组DNA。该研究开发的RPA检测技术可作为高效、便

捷、可靠的牛乳牛支原体检测工具，对牛支原体感染引发的乳腺炎快速防控具有重要应用价值。这些发现为探索替代实时PCR的简便且经济高效的新方法开辟了道路。王健霖等<sup>[32]</sup>以牛支原体UvrC基因序列为靶基因，建立的牛支原体可视化重组酶聚合酶扩增（LFD-RPA）最佳引物为F2/R2，最佳反应条件为39℃、25 min；检测灵敏度可达2.08 拷贝/ $\mu$ L，是普通PCR灵敏度的100倍；与沙门氏菌、滑液囊支原体、多杀性巴氏杆菌、绵羊肺炎支原体、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌和产气荚膜梭菌之间无交叉反应；重复性稳定，对50份鼻拭子样本进行检测，阳性率为26%，与我国行业标准PCR检测方法的符合率为89.6%，成功建立了牛支原体LFD RPA检测方法。

### 3.4 环介导等温扩增技术（LAMP）

LAMP是一种核酸扩增新技术，2000年问世，能在等温（60~65℃）条件下，借助一套4条特异性引物（一对外部引物和一对内部引物）识别靶基因的6个不同区域，在具有链置换活性的DNA聚合酶作用下实现DNA扩增。该技术具有高特异性、高效率、操作便捷、结果易鉴定等特点，广泛应用于细菌、病毒、真菌、寄生虫等病原体检测，以及转基因产品成分检测、胚胎性别鉴定等领域。金云云等<sup>[33]</sup>根据牛支原体P81基因序列设计特异性引物，建立了牛支原体LAMP检测方法。将该方法的灵敏度与巢式PCR进行对比，并用其检测牛支原体外的其他几种病原菌，同时对疑似感染牛支原体的临床病料进行检测。该方法的灵敏度比巢式PCR高1 000倍，最低检出限为1.1 ng/L，对其他几种病原菌的检测结果均为阴性，临床病料检测结果与分离培养符合率为100%。Ashraf等<sup>[34]</sup>针对UvrC、16S rRNA和gyrB 3个不同靶基因设计引物，并使用已知含有目标病原体的乳腺炎牛奶样本进行验证。通过测试LAMP引物与近缘牛乳腺炎细菌病原体的交叉反应，确定了所开发检测方法的特异性。与常规PCR相比，该检测方法显示出更高的灵敏度，并能从临床乳腺炎奶牛的PCR阴性牛奶样本中检出牛支原体。其中UvrC引物灵敏度更高，gyrB引物特异性更强，而

16S rRNA引物在特异性和灵敏度方面均逊于前者。研究结果表明，针对UvrC和gyrB基因新开发的LAMP检测方法可作为快速准确诊断牛支原体乳腺炎的有效工具。

与RPA类似，LAMP也是检测牛支原体的一种潜在的现场快速检测方法，尽管其可靠性尚需大量验证。作为一种简便且经济高效的检测手段，LAMP反应迅速，通常在2 h内即可完成。此外，该技术仅需单一恒定温度即可进行反应，无需昂贵实验室设备，因此被视为一种具有成本优势的潜在诊断工具。然而，LAMP在扩增过程中出现非特异性和非模板扩增等问题，从而影响检测结果的准确性和特异性。

## 4 结论与展望

综上所述，牛支原体乳腺炎的高效、准确检测对于疾病防控至关重要。传统微生物分离培养方法虽为“金标准”，但耗时长、效率低、操作繁琐且敏感性有限。血清学检测为群体水平感染提供了一定信息，但在个体诊断和早期感染检测方面存在局限。基于DNA的检测技术，特别是以PCR为核心的方法及其衍生技术，凭借其高灵敏度、高特异性以及快速检测的优势，已成为当前研究的焦点与主流。实时荧光定量PCR（qPCR）技术成熟、定量准确，已被广泛应用于牛支原体的快速诊断和核酸定量分析。多重qPCR的发展进一步提升了检测效率，可同时鉴别牛支原体与其他相关支原体及非致病性微生物。然而，qPCR对精密仪器和实验室条件的依赖，以及样本中复杂基质（如蛋白质、脂肪）可能导致的抑制效应，限制了其在资源匮乏地区的现场应用。为此，研究者致力于开发了如蛋白酶预处理等方法以降低干扰。RPA和LAMP等新兴等温扩增技术，凭借其操作简便、快速、无需复杂热循环仪的特点，展现出巨大的现场快速检测潜力。RPA技术结合侧流层析试纸条（LFD）可实现结果可视化判读。同样，LAMP技术因其高灵敏度和在临床样本检测中的良好表现也被视为牛支原体快速诊断的有效

备选方案。然而，这些新兴等温扩增技术在推广应用中仍面临挑战。例如，LAMP引物设计复杂且成本高，LAMP的特异性依赖于4~6条引物对靶序列6~8个区域的精准识别，引物设计需同时满足Tm值匹配、避免二级结构与引物二聚体等要求；LAMP产物污染风险高，其反应产物为大量（ $10^9 \sim 10^{10}$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ）茎环结构的双链DNA，且产物浓度远高于PCR（约 $10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ）。这些产物若通过气溶胶或交叉污染进入后续反应体系，极易导致假阳性结果。此外，LAMP也会出现非特异性扩增与假阳性。当反应体系中存在引物二聚体、非靶序列同源性较高或反应温度波动时，LAMP易出现非特异性扩增。RPA反应时间对温度敏感，RPA的最适反应温度为37~42℃，但温度波动会显著影响扩增效率。RPA反应时间通常为15~30 min，若温度控制不当，可能导致扩增失败或灵敏度下降；对样本纯度要求高，RPA对样本中的抑制物（如蛋白酶K、EDTA、酒精残留）极为敏感。上述局限性均可能影响其检测的特异性、灵敏度及操作的简便性。

展望未来，牛支原体检测技术的发展将聚焦以下几个方向：①技术优化与集成创新：持续优化现有等温扩增技术（RPA、LAMP），降低背景噪音，提高抗干扰能力（特别是针对复杂基质如牛奶），简化操作流程（如开发冻干试剂），并探索闭环检测设计以减少污染风险。同时，积极推动RPA/LAMP技术与微流控芯片、便携式读卡器、智能手机成像等平台的集成，发展真正适用于牧场环境的“样本进-结果出”一体化、自动化POCT设备。②成本控制与可及性提升：开发高效、低成本的样本前处理方法，减少或避免对昂贵商业化DNA提取试剂盒的依赖，是降低等温扩增技术整体成本、使其更易于在基层兽医站和牧场推广的关键。③多重检测与多组学融合：发展可同时检测牛支原体及其主要共病原体（如其他致病性支原体、细菌）的多重等温扩增或基于微阵列的检测技术，提供更全面的病原信息。探索将核酸扩增技术与蛋白质组学（如质谱分析）或代谢组学检测相结合，为疾病的诊

断、分型和预后提供更丰富的生物学信息。④标准化与验证：亟需建立统一、严格的方法学评价标准和临床验证流程，对新开发或优化的检测方法进行大规模、多中心的性能评估，确保其敏感性、特异性、重复性、稳健性满足临床应用要求，并推动标准化试剂盒的研发和注册。⑤智能化与大数据应用：结合人工智能算法优化引物设计、结果判读和数据分析。利用大数据平台整合检测结果、流行病学信息和牧场管理数据，为精准防控和决策提供支持。

为促进检测技术在基层推广应用，应在政策支持、技术培训、标准化体系建设方面加强建设，以增强行业指导性。应加大财政投入，设立专项补贴或采购计划，降低牧场和基层兽医机构采用新技术的成本。推动建立区域性或全国性的牛支原体检测网络平台，实现检测数据共享、疫情预警与溯源分析，提升整体防控效能。同时，加强基层兽医人员的专业培训，使其熟练掌握新型检测技术的操作规范、结果判读和质量控制要点，确保检测结果的准确性和可靠性。通过构建完善的标准化应用推广体系，将先进的检测技术真正转化为基层可操作、牧场可负担、防控有效的工具，最终提升我国牛支原体相关疾病的综合防控能力和水平。

#### 参考文献

- [1] Walz P H, Mullaney T P, Render J A, et al. Otitis media in preweaned holstein dairy calves in michigan due to mycoplasma bovis[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1997, 9: 250-254.
- [2] 邹美娟. 基于RAA-CRISPR/Cas12a技术的牛支原体快速检测方法的建立[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2024.
- [3] 温靖, 李丹, 郭婷, 等. 中国奶牛牛支原体流行病学调查分析[J]. 中国农业大学学报, 2022, 27 (3): 75-82.
- [4] McAuliffe L, Kokotovic B, Ayling R D, et al. Molecular epidemiological analysis of mycoplasma bovis isolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters[J]. Clinical Microbiology, 2004, 42: 4556-4565.
- [5] 冷婧. 新疆南疆集约化牛场牛支原体病流行病学调查、病原分离鉴定及耐药基因检测[D]. 塔里木: 塔里木大学, 2023.
- [6] 王天宇, 李继东, 张志诚, 等. 牛支原体病流行病学及其诊断技术研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53 (12): 134-139.

- [7] Parker A M, House J K, Hazelton M S, et al.Milk acidification to control the growth of mycoplasma bovis and salmonella dublin in contaminated milk[J].Journal of Dairy Science, 2016, 99: 9875-9884.
- [8] Biddle M K, Fox L K, Hancock D D, et al.Effects of storage time and thawing methods on the recovery of mycoplasma species in milk samples from cows with intramammary infections[J].Journal of Dairy Science, 2004, 87: 933-936.
- [9] Biddle M K, Fox L K, Hancock D D.Patterns of mycoplasma shedding in the milk of dairy cows with intramammary mycoplasma infection[J].Journal of the American Veterinary Medical Association, 2003, 223: 1163-1166.
- [10] Gonzalez R N, Wilson D J.Mycoplasma mastitis in dairy herds[J].Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 2003, 19: 199-221.
- [11] 李祥慧, 徐明国, 马海龙, 等.基于牛支原体重组蛋白rMbovP730的间接ELISA方法的建立与应用[J].中国预防兽医学报, 2024, 46 (12): 1255-1260.
- [12] 张妍, 战力源, 姜福洁, 等.牛支原体重组蛋白P48原核表达、多克隆抗体制备及间接ELISA抗体检测方法的建立[J].中国畜牧兽医, 2023, 50 (11): 4621-4631.
- [13] 庄金秋, 梅建国, 刘吉山, 等.牛支原体实验室检测方法研究进展[J].中国奶牛, 2017 (2): 30-34.
- [14] Sekiya M, Zintl A, Doherty M L.Bulk milk ELISA and the diagnosis of parasite infections in dairy herds: A review[J].Irish Veterinary Journal, 2013, 66 (1): 14.
- [15] Sachse K, Pfützner H, Hotzel H, et al.Comparison of various diagnostic methods for the detection of mycoplasma bovis[J].Scientific and Technical Review, 1993, 12 (2): 571-580.
- [16] Kumar A, Srivastava N C, Singh V P, et al.Electrophoretic analysis of Indian isolates of mycoplasma agalactiae and mycoplasma bovis by SDS-PAGE and immunoblotting[J].Veterinary Medicine International, 2014, 2014: 892421.
- [17] Infante Martinez F, Jasper D E, Stott J L, et al.Immunobinding assay for detection of mycoplasma bovis in milk[J].Canadian Journal of Veterinary Research, 1990, 54: 251-255.
- [18] Infante F.Improved immunobinding test using monoclonal antibodies for detection of mycoplasma bovis in milk[J].Canadian Journal of Veterinary Research, 2002, 66: 282-284.
- [19] Flores-Gutiérrez G H, Infante F, Salinas-Meléndez J A, et al.Development of a rapid immunobinding test for mycoplasma bovis cultural isolates in the genital tract of heifers[J].Italian Journal of Animal Science, 2009, 8: 285-290.
- [20] 田可昕.牛支原体重组蛋白胶体金免疫层析试验方法的建立与应用[D].乌鲁木齐市: 新疆农业大学, 2023.
- [21] 周华倩.牛支原体抗体检测胶体金免疫层析试纸条的研制及初步应用[D].北京: 中国农业科学院, 2021.
- [22] 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.
- [23] Pinnow C, Butler J, Sachse K, et al.Detection of mycoplasma bovis in preservative-treated field milk samples[J].Journal of Dairy Science, 2001, 84 (7): 1640-1645.
- [24] Koskinen M T, Holopainen J, Pyörälä S, et al.Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens[J].Journal of Dairy Science, 2009, 92 (3): 952-959.
- [25] 肖静.牛支原体实时荧光定量PCR检测方法的建立[D].武汉: 华中农业大学, 2024.
- [26] 李建, 高航飞, 安维雪, 等.牛支原体TaqMan实时荧光定量PCR检测方法的建立[J].中国兽医学报, 2017, 37 (6): 1059-1064.
- [27] 翟肖辉, 王方国, 郝华芳, 等.牛支原体TaqMan探针实时荧光定量PCR检测方法的建立及应用[J].畜牧与兽医, 2019, 51 (8): 105-109.
- [28] Chauhan K, Aly S S, Lehenbauer T W, et al.Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection of mycoplasma bovis, mycoplasma species, and acholeplasma laidlawii in milk[J].Peer J, 2021, 9: e11881.
- [29] Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L, et al.DNA detection using recombination proteins[J].PLOS Biology, 2006, 4, e204.
- [30] Rossetti B C, Frey J, Pilo P.Direct detection of mycoplasma bovis in milk and tissue samples by real-time PCR[J].Molecular and Cellular Probes, 2010, 24: 321-323.
- [31] Li R W, Wang J F, Sun X, et al.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.
- [32] 王健霖, 田兴苗, 王景松, 等.牛支原体可视化重组酶聚合酶扩增检测方法的建立[J].浙江农业学报, 2024, 36 (8): 1811-1819.
- [33] 金云云, 王静梅, 剡根强.基于牛支原体P81基因环介导等温扩增方法的建立及应用[J].中国兽医学报, 2014, 34 (4): 571-577, 582.
- [34] Ashraf A, Imran M, Yaqub T, et al.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.