

# 基于 *gcp* 基因的溶血性曼氏杆菌 LAMP 检测方法的建立

钟舒红<sup>1</sup>, 韩林梅<sup>2</sup>, 吴翠兰<sup>1</sup>, 彭昊<sup>1</sup>, 冯世文<sup>1</sup>, 贺会利<sup>1</sup>, 马春霞<sup>1</sup>,  
禩雄标<sup>1</sup>, 李军<sup>1\*</sup>, 曾芸<sup>2\*</sup>

(1. 广西兽医研究所 广西兽医生物技术重点实验室, 广西 南宁 530001;  
2. 广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530004)

**摘要:** 为建立一种快速、准确并可定量检测溶血性曼氏杆菌的环介导等温扩增(LAMP)方法,本研究针对溶血性曼氏杆菌 *gcp* 基因设计 5 条特异性引物,在链置换 DNA 聚合酶的作用下,优化反应条件,并进行特异性和敏感性试验。特异性检测结果表明,建立的 LAMP 扩增方法可以在 65 min 内完成,并具有良好的特异性,检测化脓隐秘杆菌、肺炎克雷伯氏菌、大肠杆菌、牛支原体、鼠伤寒沙门菌、溶血性巴氏杆菌等其他 6 种常见牛呼吸道综合征致病菌和空白对照(水)时结果均为阴性;灵敏性检测结果表明,建立的 LAMP 方法检测溶血性曼氏杆菌质粒标准品的最低检出浓度为  $0.855 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L;在对临床样品的检测中,本研究建立的 LAMP 方法对溶血性曼氏杆菌的检出率为 52.63%(10/19)大于 PCR 方法的检出率 47.36%(9/19)。以上结果表明,本研究建立的基于 *gcp* 基因的溶血性曼氏杆菌 LAMP 检测方法为溶血性曼氏杆菌的快速检测提供了一种新的技术手段,该方法特异性强、灵敏度高、快速简便,可将该方法推广至基层和流行病学调查一线,应用于该病原的快速检测。

**关键词:** 溶血性曼氏杆菌; *gcp*; 环介导等温核酸扩增; PCR

## Establishment of LAMP detection method for *M. haemolyticus* based on *gcp* gene

ZHONG Shu-hong<sup>1</sup>, HAN Lin-mei<sup>2</sup>, WU Cui-lan<sup>1</sup>, PENG Hao<sup>1</sup>, FENG Shi-wen<sup>1</sup>, HE Hui-li<sup>1</sup>,  
MA Chun-xia<sup>1</sup>, XUAN Xiong-biao<sup>1</sup>, LI Jun<sup>1\*</sup>, ZENG Yun<sup>2\*</sup>

(1. Guangxi Veterinary Research Institute/Guangxi Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Nanning 530001, China;  
2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract:** In order to establish a rapid, accurate and quantitative loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for the detection of *M. haemolyticus*, five specific primers were designed for the *gcp* gene of *M. haemolyticus*. The reaction conditions were optimized, and the specificity and sensitivity tests were carried out with the action of the chain replacement DNA polymerase. The specificity test results showed that the established LAMP amplification reaction could be completed in 65 min and had good specificity. The detection results were negative for other pathogenic bacteria such as *Cryptobaci-*

收稿日期:2022-05-05;修回日期:2022-08-03

基金项目:广西重点研发计划项目(桂科AB21238003, AB16380106);桂科专项项目(21-6);南宁市重点研发计划项目(20212023);良庆区重点研发计划项目(202109)

作者简介:钟舒红(1986-),女,广西桂林人,硕士生,高级兽医师,研究方向为动物疫病防控与病原分子生物学, E-mail: zhongshuhong11@163.com。\*通讯作者,李军(1971-),男,广东梅州人,正高级兽医师,博士生,研究方向为动物疫病防控与病原分子生物学, E-mail: jlee9981@163.com;曾芸(1972-),女,广西河池人,副教授,主要从事兽医药理与毒理学研究, E-mail: yeng323@163.com。

*llus pyogenes, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Mycoplasma bovis, Salmonella typhimurium, Pasteurella hemolytica* and negative control (water). The sensitivity test results showed that the minimum detection concentration of the established LAMP method was  $0.855 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L. In the detection of clinical samples, the positive detection rate of LAMP method established in this study was 52.63% (10/19), which was higher than that of PCR method 47.36% (9/19). In conclusion, the LAMP method based on *gcp* gene established in this study provides a new technical method for rapid detection of *M. hemolyticus*. This method has strong specificity, high sensitivity, rapid and simple characteristics, and can be extended to the grassroots and the front line of epidemic investigation for rapid detection of the pathogen.

**Key words:** *M. haemolyticus*; *gcp*; loop-mediated isothermal amplification (LAMP); PCR

\* **Corresponding authors:** LI Jun, E-mail: jlee9981@163.com; ZENG Yun, E-mail: yeng323@163.com

溶血性曼氏杆菌 (*Mannheimia haemolytica*, MH) 为巴氏杆菌科的一种革兰氏阴性球菌, 为存在于牛、羊等反刍动物呼吸系统的一种重要的条件致病菌<sup>[1]</sup>。当动物因长途运输、饲养条件及天气环境变化而受到应激, 或因支原体和病毒等病原感染而导致免疫功能下降时, 其会迅速增殖并下行扩散至肺部, 引起严重的肺炎<sup>[2]</sup>。溶血性曼氏杆菌也是引起牛呼吸道疾病综合征最为重要的病原之一<sup>[3-4]</sup>。同时, 该病原也能感染山羊、绵羊等小反刍动物以及美洲野牛、麋鹿和叉角羚等反刍野生动物。也有研究发现, 他还能感染猪、兔、猫、狗、骡等某些非反刍动物<sup>[5]</sup>。目前, 溶血性曼氏杆菌在世界范围内呈广泛流行趋势, 给世界牛羊养殖业造成巨大的经济损失<sup>[4-6]</sup>。我国也普遍存在溶血性曼氏杆菌感染牛羊的现象<sup>[7-9]</sup>, 给牛羊养殖业带来巨大威胁。

目前, 针对溶血性曼氏杆菌的检测方法主要包括传统的细菌学方法(形态学观察)<sup>[10]</sup>、免疫学检测(ELISA)<sup>[11]</sup>和分子生物学检测方法(PCR/荧光定量 PCR)<sup>[12-13]</sup>。但传统的细菌学方法不仅费时费力, 且该菌的分离率较低, 较难分离得到该菌; 血清学检测方法虽然操作相对简单, 在敏感性和特异性上均有很大提高, 但存在空窗期、交叉反应等问题; 基于核酸检测的 PCR/荧光定量 PCR 等分子生物学检测技术因其具有良好的敏感性和特异性, 是一种较理想的病原学检测方法, 但这两种方法存在仪器昂贵, 对操作人员技术要求高的缺点, 难以在基层和流行病学调查一线推广应用<sup>[14-15]</sup>。

环介导等温扩增(LAMP)是一种新颖的核酸扩增技术, 其原理是针对目的基因的 6 个区域设计 4 条特异性引物, 并在具有链置换特性的 *Bst* DNA 聚合酶作用下, 在恒定的温度(60~65 °C)下即可完成靶 DNA 的特异性扩增<sup>[16]</sup>。与常规 PCR 方法相比, 克服了 PCR 反应需要反复的热变性、复性、延伸过程获得单链模板的缺点, 实现了恒温条件下的连续快速

扩增, 具有更高的灵敏度和扩增效率, 从而实现快速、特异、灵敏、简便的检测。LAMP 检测方法已用于多种病原菌的检测<sup>[17-19]</sup>, 基于 LAMP 的优点, 本研究建立了一种基于溶血性曼氏杆菌唾液淀粉酶 *gcp* 基因检测的高效、敏感、可定量的 LAMP 检测方法。本方法通过浊度仪实时监控反应管的扩增情况, 反应结束即可获得结果, 避免了人为肉眼观察导致的主观判断失误; 同时, 本方法不需打开反应管的盖子, 在扩增产物中加入荧光染料显色或者将扩增产物进行凝胶电泳观察梯形条带等判定结果, 可有效避免气溶胶以及凝胶电泳染料对环境的污染。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 细菌菌株 溶血性曼氏杆菌 (*Mannheimia haemolytica*)、化脓隐秘杆菌 (*Trueperella pyogenes*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、牛支原体 (*Mycoplasma bovis*)、鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*)、溶血性巴氏杆菌 (*Pasteurella hemolytica*), 均由广西壮族自治区兽医研究所细菌研究室鉴定和保存。

1.1.2 主要试剂与仪器 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司。绵羊血平板购自北京路桥技术股份有限公司。Loopamp DNA 扩增试剂盒购自日本荣研生物科技有限公司。Bst DNA 聚合酶购自北京蓝谱生物科技有限公司。PCR Master Mix, DNA Marker 等均购自天根生化科技(北京)有限公司。SYBR Green I 购自 Invitrogen 公司。实时浊度仪(Tubidimeter real-time LA-320)购自日本荣研生物科技有限公司。

1.1.3 临床样品 本实验室从广西部分养殖场收集 19 份牛羊呼吸道系统疫病的病料组织样品。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的制备 病原菌培养物: 将实验

室分离鉴定保存的溶血性曼氏杆菌划线接种于绵羊血平板,37 °C 培养 24 h。接种环刮取部分菌落重悬于 200  $\mu$ L PBS 中,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取病原菌基因组 DNA。组织样品:病料组织用 PBS 清洗,利用组织研磨均质仪进行研磨,反复冻融 3 次,离心后取上清,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取病原菌基因组 DNA。

表 1 LAMP 扩增引物序列

Table 1 Sequences of primers for LAMP

目的基因 Target gene	引物 Primers	核苷酸序列(5'→3') Nucleotide sequences
<i>gcp</i>	F3	GGCAATACGAACTACTCGG
	B3	TCGTATTCGCAGCAAAGGTT
	FIP	GCTACACCGGCAGGGTAATCCCCGGTGAAGCCTTTGACAA
	BIP	ATTAGCCGAATCCGGCAGCATCCAGTCCCGGTCTGTC
	LB	GTTTAAATTCCTCGTCCAATGAC

1.2.3 LAMP 反应检测 LAMP 反应的建立:采用 Loopamp DNA 扩增试剂盒进行 LAMP 反应,反应体系为 25  $\mu$ L:2  $\times$  Reaction Mix 12.5  $\mu$ L, *Bst* DNA 聚合酶 1  $\mu$ L,外引物 F3 和 B3 各 0.5  $\mu$ L,内引物 FIP 和 BIP 各 0.5  $\mu$ L,环引物 LB 1  $\mu$ L,基因组 DNA 2  $\mu$ L,超纯水补足 25  $\mu$ L。LAMP 反应程序:反应在 LA-320C 实时浊度仪中进行,浊度仪实时监控扩增情况,反应程序为 63 °C 保持 60 min,然后 85 °C 灭活 5 min。并以蒸馏水代替 DNA 模板作为阴性对照。

1.2.4 PCR 扩增检测 采用 F3 和 B3 为扩增引物进行溶血性曼氏杆菌 *gcp* 基因的 PCR 检测,扩增长度为 220 bp。PCR 反应总体积为 25  $\mu$ L,包括 PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L,引物 F3 和 B3 各 1  $\mu$ L、基因组 DNA 3  $\mu$ L,RNase-Free water 补足 25  $\mu$ L。反应条件为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,51 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环;72 °C 最终延伸 5 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 溶血性曼氏杆菌标准品制备 以溶血性曼氏杆菌 DNA 为模板,以本 LAMP 方法设计的外引物 F3 和 B3 为 PCR 扩增引物,将 PCR 扩增得到的目的基因片段连接于载体 pMD18-T,转化大肠杆菌感受细胞 DH-5 $\alpha$ ,氨苄西林抗性筛选获得单克隆菌,用质粒小量抽提试剂盒抽提质粒,经 PCR 鉴定,重组质粒送上海英骏生物技术有限公司进行测序确定。纯化阳性重组质粒 pMD18-T-*gcp*,测定起始浓度后作为标准样品,-80 °C 保存备用。

1.2.6 LAMP 检测方法的特异性试验 以溶血性曼氏杆菌为阳性对照,以蒸馏水为阴性对照,以化脓

1.2.2 LAMP 引物的设计与合成 参考 GenBank 登录的多株溶血性曼氏杆菌唾液淀粉酶 *gcp* 基因序列,进行 *gcp* 基因序列比对,选取保守区域,采用 Primer Explorer version 5 (<http://primerexplorer.jp/lamp>)设计扩增该基因的特异性 LAMP 引物,包括外引物 F3/B3、内引物 FIP/BIP 和环引物 LB(见表 1)。引物由上海英骏生物有限公司合成。

隐秘杆菌、肺炎克雷伯氏菌、大肠杆菌、牛支原体、鼠伤寒沙门菌、溶血性巴氏杆菌作为参考细菌,进行 LAMP 的特异性检测。

1.2.7 LAMP 检测灵敏性试验 取标准样品重组质粒 pMD18-T-*gcp*,测定其起始浓度为  $0.855 \times 10^1$  ng/ $\mu$ L,用 RNA-Free Water 进行连续 10 倍倍比稀释,稀释后的浓度范围为  $0.855 \times 10^1 \sim 0.855 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L,取各稀释度 2  $\mu$ L 作为模板进行 LAMP 和 PCR 扩增,比较其检测灵敏度。

1.2.8 LAMP 扩增标准曲线的建立 取溶血性曼氏杆菌基因组 DNA 浓度为  $0.855 \times 10^1 \sim 0.855 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L 的重组质粒 pMD18-T-*gcp* 标准样品用做 LAMP 测定的标准模板,采用 F3/B3 引物进行 LAMP 扩增。当浊度为 0.1 时,由于 DNA 浓度的负对数与浊度之间存在线性关系,可以通过记录浊度和时间点来绘制标准曲线,并通过 LAMP 扩增曲线确定细菌拷贝数。

1.2.9 结果判定 实时浊度仪监测反应扩增情况,仪器通过读取反应管的浊度值并绘制浊度曲线,出现浊度上升曲线的判为阳性结果,没有出现浊度上升曲线的判为阴性结果,反应结束即可获得结果。

1.2.10 临床样品检测 采用本研究建立的 LAMP 方法和 PCR 检测技术,对本实验室从广西部分养殖场收集的呼吸道系统疫病的病料组织样品 19 份,进行溶血性曼氏杆菌 *gcp* 基因检测,以此评估建立的 LAMP 方法在临床检测上的实用性。



## 2 结果

### 2.1 溶血性曼氏杆菌 LAMP 检测的特异性分析

以溶血性曼氏杆菌为阳性菌株,蒸馏水为阴性对照,6 株牛羊养殖中常见的致病菌为参考菌株,对 LAMP 引物进行特异性检测,由图 1 可知,仅以携带 *gcp* 基因的溶血性曼氏杆菌能检测到扩增产物,出现浊度曲线,其他 6 种参考细菌和阴性对照均无浊度曲线。表明该引物组可用于溶血性曼氏杆菌 *gcp* 基因的扩增,因此将引物 FIP 和 BIP 用做 LAMP 反应的引物。

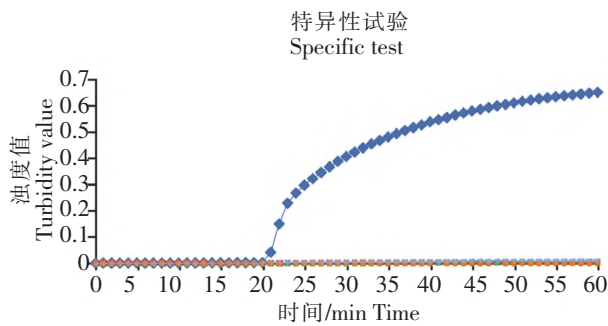


图 1 LAMP 方法的特异性

Figure 1 Specificity analyses for LAMP

1: 溶血性曼氏杆菌; 2: 化脓隐秘杆菌; 3: 肺炎克雷伯氏菌; 4: 大肠杆菌; 5: 牛支原体; 6: 鼠伤寒沙门菌; 7: 溶血性巴氏杆菌; 8: 蒸馏水。  
1: *Mannheimia haemolytica*; 2: *Trueperella pyogenes*; 3: *Klebsiella pneumoniae*; 4: *Escherichia coli*; 5: *Mycoplasma bovis*; 6: *Salmonella typhimurium*; 7: *Pasteurella hemolytica*; 8: Distilled water.

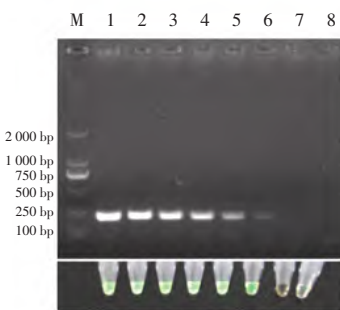
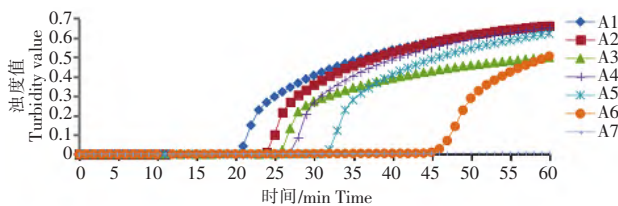


图 2 LAMP(A)和 PCR(B)方法的灵敏性比较

Figure 2 Comparison of Sensitivity analyses for LAMP (A) and PCR (B)

M: 分子质量标准 DL2000; A1~A7:  $0.855 \times 10^1 \sim 0.855 \times 10^{-5}$  ng/  $\mu$ L; 8: 阴性对照。

M: DL2000 DNA Marker; A1—A7:  $0.855 \times 10^1 \sim 0.855 \times 10^{-5}$  ng/  $\mu$ L; 8: Negative control.

### 2.2 溶血性曼氏杆菌 LAMP 方法的灵敏性分析

由图 2 可知,本研究建立的 LAMP 和 PCR 对溶血性曼氏杆菌质粒标准品的最低检出浓度均为  $0.855 \times 10^{-4}$  ng/  $\mu$ L。溶血性曼氏杆菌基因组浓度在  $0.855 \times 10^1 \sim 0.855 \times 10^{-4}$  ng/  $\mu$ L 间的 6 个浓度, LAMP 反应孵育期分别为 20、24、25、27、31、45 min (图 2A), 可检测溶血性曼氏杆菌存在的最早时间点少于 30 min。通过直接目视检测法研究发现, LAMP 检测溶血性曼氏杆菌质粒标准品的最低检出浓度也为  $0.855 \times 10^{-4}$  ng/  $\mu$ L。

### 2.3 LAMP 扩增标准曲线的建立

使用 5 个浓度梯度的溶血性曼氏杆菌质粒标准品作为模板进行 LAMP 扩增,并构建 LAMP 扩增标准曲线,标准曲线为  $Y=0.3519X-8.5797$ , 相关系数  $R^2=0.9925$ , 呈良好的线性关系。其中, X 表示 LAMP 反应所用的时间段, Y 表示溶血曼氏杆菌 DNA 浓度的负对数 (图 3)。

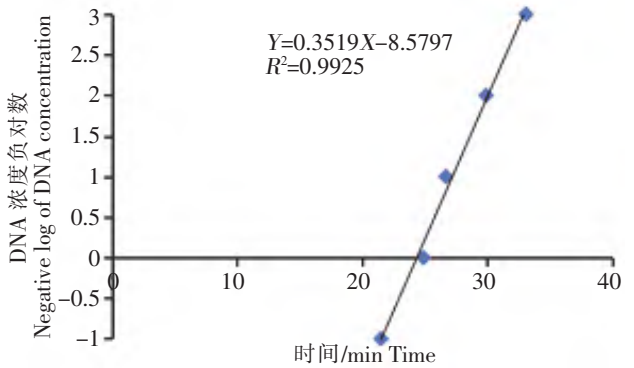


图 3 LAMP 扩增的标准曲线

Figure 3 Standard curve of LAMP amplification

### 2.4 临床样品的检测

对本实验室收集的 19 份牛羊呼吸道系统疫病的病料组织样品,使用本研究建立的 LAMP 方法和常规 PCR 方法分别进行溶血性曼氏杆菌 *gcp* 基因

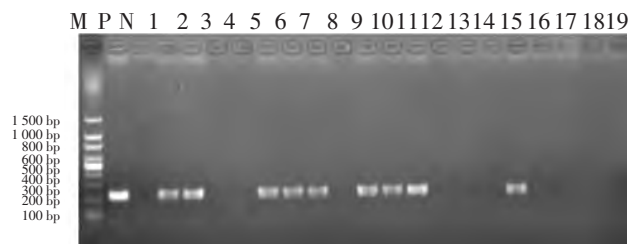


图 4 临床样品检测

Figure 4 The results for clinical sample

M: DNA 分子质量标准; P: 阳性对照; N: 阴性对照; 1~19 临床样品组织。

M: DL1500 DNA Marker; P: Positive control; N: Negative control; 1—19: Samples.

扩增。结果显示,19 份样品中,9 份样品经 PCR 方法扩增出目的条带,阳性检出率为 47.36%(9/19);运用 LAMP 方法有 10 份样品获得浊度曲线,呈现阳性结果,阳性检出率为 52.63%(10/19)。

### 3 讨论

溶血性曼氏杆菌是反刍动物(牛、羊)肺炎、新生羔羊急性败血症的重要病原菌。Timsit 等<sup>[20]</sup>的研究结果显示在引起牛呼吸道疾病综合征的病原中溶血性曼氏杆菌占比为 30.5%。吴翠兰等<sup>[9]</sup>在前期的调查研究中发现,引起广西牛呼吸道疾病综合征的病原中溶血性曼氏杆菌占比高达 40.1%。对于该病的治疗原则是尽早发现,及时治疗,否则该病易与其他病原菌如溶血性巴氏杆菌、化脓隐秘杆菌、支原体等混合感染而加大治疗难度<sup>[20]</sup>。在目前,针对溶血性曼氏杆菌的检测方法主要包括传统的细菌学方法、免疫学检测和分子生物学检测方法。冯旭飞等<sup>[10]</sup>在绵羊肺脏中溶血性曼氏杆菌的分离鉴定及其药物敏感性分析的研究报道表明传统的细菌学方法不仅费时费力,且该菌的分离率较低,较难分离得到该菌。Shangthalingam 等<sup>[21]</sup>报道在对溶血性曼氏杆菌进行病原学分离和 PCR 检测时显示其病原分离率(3%)远远小于 PCR 检出率(77%)。PCR/荧光定量 PCR 等分子生物学检测技术因其具有良好的敏感性和特异性,是一种较理想的病原学检测方法,但这两种方法存在仪器昂贵,对操作人员技术要求高的缺点,难以在基层和流行病学调查前线推广应用。LAMP 检测方法以其操作简单、特异性强、灵敏度高,成本低等优点,更适用于基层养殖企业和流行病学调查前线对病原的实地检测。

本研究首次建立了以溶血性曼氏杆菌 *gcp* 基因为目标基因的 LAMP 检测方法,结果表明该方法具有较高的特性性,对溶血性曼氏杆菌以及化脓隐秘杆菌、肺炎克雷伯氏菌、大肠杆菌、牛支原体、鼠伤寒沙门菌、溶血性巴氏杆菌等 6 种常见引起牛呼吸道疫病综合征的病原菌进行特异性检测,结果显示仅溶血性曼氏杆菌为模板的扩增产物出现浊度曲线;在敏感性试验中,本研究建立的 LAMP 检测方法对溶血性曼氏杆菌的最低检测浓度为  $0.855 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L,与本实验室建立的溶血性曼氏杆菌 PCR 检测方法的检测限相同;在对临床样品的检测中,本研究建立的 LAMP 方法对溶血性曼氏杆菌的阳性检出率 52.63%(10/19)大于 PCR 方法的阳性检出率 47.36%(9/19),表明本研究建立的 LAMP 方法为溶血性曼氏杆菌的临床快速检测提供了一种新的技

术手段。同时,本研究建立的 LAMP 检测方法与其他方法相比,有以下优势:(1)成本低、操作简单。本研究建立的 LAMP 检测方法只需要一台浊度仪,而 PCR 检测方法需要有 PCR 仪,凝胶成像系统,电泳仪等仪器,在操作性以及使用成本方面都有一定的局限性。(2)检测耗时短。溶血性曼氏杆菌在血平板上需要 20 小时以上才长出明显菌落,生化试验通常耗时 24~72 h,做出正确的鉴定将花费 3~4 d 时间,本研究建立的 LAMP 检测方法反应在 20~25 min 出现扩增,60 min 内即可完成扩增,且扩增结束即可判断结果,不需要再进行琼脂糖凝胶电泳紫外线分析,从样品基因组 DNA 提取到获得最终结果可在 2~3 h 内完成。(3)不造成污染。常规的 LAMP 方法在反应结束后,通过肉眼判断白色沉淀及开盖在扩增产物中加入荧光染料显色或者将扩增产物直接凝胶电泳观察梯形条带等判定结果<sup>[22-23]</sup>,打开反应管加荧光染料容易造成实验室气溶胶污染,凝胶电泳使用的染料对环境也造成污染,本方法通过浊度仪实时监控反应管的扩增情况,无需开盖即能准确判定结果,能有效避免气溶胶污染。(4)可实时定量,本研究利用 Tubidimeter real-time LA-320C 浊度仪来实时分析 LAMP 反应的结果,不同标准样品浓度的负对数及其对应的浊度值达到 0.1 所需的时间成线性关系,由此绘制标准曲线,获得标准曲线方程,即可进行定量检测。

综上所述,本研究建立的基于 *gcp* 基因的溶血性曼氏杆菌 LAMP 检测方法为溶血性曼氏杆菌的快速检测提供了一种新的技术手段,该方法特异性强、灵敏度高、快速简便,可将该方法推广至基层和流行病学调查前线,应用于该病原的快速检测。

### 参考文献 (References)

- [1] SCHAFFER A P, LARSON R L, CERNICCHIARO N, et al. The association between calfhood bovine respiratory disease complex and subsequent departure from the herd, milk production, and reproduction in dairy cattle[J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2016, 248(10): 1157-1164.
- [2] 胡玉婷, 杨发龙, 刀筱芳. 溶血性曼氏杆菌及其毒力因子研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 2021, 57(8): 59-64.  
HU Yu-ting, YANG Fa-long, DAO You-fang. Research progress of *Mansteurella haemolyticus* and its virulence factors[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2021, 57(8): 59-64. (in Chinese)
- [3] SINGH K, RITCHEY J W, CONFER A W. *Mannheimia haemolytica*: bacterial-host interactions in bovine pneu

- monia [J]. *Veterinary Pathology*, 2011, 48 (2): 338-348.
- [4] CROSBY S, CREDILLE B, GIGURE S, et al. Comparative efficacy of enrofloxacin to that of tulathromycin for the control of bovine respiratory disease and prevalence of antimicrobial resistance in *Mannheimia haemolytica* in calves at high risk of developing bovine respiratory disease [J]. *Journal of Animal Science*, 2018, 96(4): 1259-1267.
- [5] DZIVA F, MOHAN K. Pasteurellosis and *Pasteurellae* in Zimbabwe: An update [J]. *Zimbabwe Veterinary Journal*, 2000, 30(3-4): 1-10.
- [6] FERNANDEZ S, GALAPERO J, GOMEZ L, et al. *Mannheimia haemolytica* and *Bibersteinia trehalosi* serotypes isolated from merino breed lambs in extremadura (Southwestern Spain) [J]. *Indian J Microbiology*, 2016, 56(4): 513-515.
- [7] 朱利霞. 河北省肉牛常见呼吸道致病菌的分离鉴定及多重 PCR 检测方法研究 [D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2019.
- ZHU Li-xia. Isolation and identification of beef cattle common respiratory pathogenic bacteria in hebei province and research on multiplex PCR detection method [D]. Qing huang dao: Hebei Normal University of Science and Technology, 2019. (in Chinese)
- [8] 刘镜, 姜玲玲, 杨莉, 等. 贵州地区肉牛 BRDC 的 4 种病原调查与分析 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(12): 69-73.
- LIU Jing, JIANG Ling-ling, YANG Li, et al. Investigation and analysis of 4 pathogens of BRDC in beef cattle in Guizhou region [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2021 (12): 69-73. (in Chinese)
- [9] 吴翠兰, 彭昊, 李军, 等. 2016—2017 年广西牛呼吸道疾病综合征病原学的调查研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(12): 3535-3544.
- WU Cui-lan, PENG Hao, LI Jun, et al. Research on etiology of bovine respiratory disease complex in Guangxi during 2016 to 2017 [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(12): 3535-3544. (in Chinese)
- [10] 冯旭飞, 刀筱芳, 王志敏, 等. 绵羊肺脏中溶血性曼氏杆菌的分离鉴定及其药物敏感性分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(8): 224-228.
- FENG Xun-fei, DAO You-fang, WANG Zhi-min, et al. Isolation, identification and antibiotics susceptibility of *Mannheimia haemolytica* from sheep lungs [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41(8): 224-228. (in Chinese)
- [11] 张智, 刘泽, 杜宇, 等. 溶血性曼氏杆菌 PlpE 基因原核表达及间接 ELISA 方法的建立 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(2): 79-84.
- ZHANG Zhi, LIU Ze, DU Yu, et al. Prokaryotic expression of PlpE gene of *Mannheimia haemolytica* and establishment of indirect ELISA method [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2022(2): 79-84. (in Chinese)
- [12] 刘心, 彭清洁, 彭永崇, 等. 牛溶血曼氏杆菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. 中国兽医学报, 2020, 40(6): 1131-1135.
- LIU Xin, PENG Qing-jie, PENG Yong-chong, et al. Isolation, identification and drug sensitivity test of *Mannheimia haemolytica* in cattle [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 40(6): 1131-1135. (in Chinese)
- [13] 李富祥, 高华峰, 赵文华, 等. 化脓隐秘杆菌和溶血性曼氏杆菌双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2021, 51(7): 821-827.
- LI Fu-xiang, GAO Hua-feng, ZHAO Wen-hua, et al. Development of duplex TaqMan real-time PCR assay for detection of *Trueperella pyogenes* and *Mannheimia haemolytica* [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2021, 51(7): 821-827. (in Chinese)
- [14] 李科, 刘燕, 韦强, 等. 免溶血性巴氏杆菌环介导等温扩增检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(11): 903-906.
- LI Ke, LIU Yan, WEI Qiang, et al. Establishment of LAMP for detection of rabbit *Pasteurella multocida* [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary*, 2013, 35(11): 903-906. (in Chinese)
- [15] REGISTER K B, YERSIN A G. Analytical verification of a PCR for identification of *Bordetella avium* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43: 5567-5573.
- [16] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): E63.
- [17] 刘丹, 谢家玲, 张孟雨, 等. 基于实时荧光 LAMP 同时检测副溶血弧菌与金黄色葡萄球菌 [J/OL]. 食品与发酵工业, DOI: 10. 13995/j. cnki. 11-1802/ts. 031255.
- LIU Dan, XIE Jia-ling, ZHANG Meng-yu, et al. Simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus* by real-time LAMP [J/OL]. *Food and Fermentation Industries*, DOI: 10. 13995/j. cnki. 11-1802/ts. 031255. (in Chinese)
- [18] 马佳睿, 谢婧, 李瑞乾, 等. LAMP 在食源性致病菌检测中的应用进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(17): 39-43.
- MA Jia-Rui, XIE Jing, LI Rui-qian, et al. Application progress on LAMP in detection of food-borne pathogens [J]. *Heilongjiang Animal Science and Ve-*

- terinary Medicine*,2021(17):39-43. (in Chinese)
- [19] 吴效晋,刘刚,胡洪营,等. 环介导等温扩增(LAMP)技术检测水源病原菌[J]. 环境工程,2021,39(12):10-17,37.
- WU Xiao-jin,LIU G,HU HY,*et al.* Detection of water-borne pathogens by Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)[J]. *Environmental Engineering*, 2021,39(12):10-17,37. (in Chinese)
- [20] TIMSIT E,HALLEWELL J,BOOLER C,*et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica*,*Pasteurella multocida*,and *Histophilus somni* isolated from the lower respiratory tract of healthy feedlot cattle and those diagnosed with bovine respiratory disease [J]. *Veterinary Microbiology*,2017,208:118-125.
- [21] SHANTHALINGAM S,GOLDY A,BAVANAN T J,*et al.* PCR assay detects *Mannheimia haemolytica* in culture-negative pneumonic lung tissues of bigborn sheep (*Ovis canadensis*)from outbreaks in the western USA,2009-2010[J]. *Journal Wildlife Disease*,2014,50(1):1-10.
- [22] 王西,胡仲皓,杜晓莉,等. 建立基于 *fimY* 基因的环介导等温核酸扩增(LAMP)技术检测食源性沙门菌[J/OL]. 中国动物传染病学报,<http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2031.S.20200707.1427.014.html>.
- WANG Xi,HU Zhong-hao,DU Xiao-li,*et al.* Development of Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based on *fimY* gene for detection of food borne *Salmonella*[J/OL]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases* ,<http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2031.S.20200707.1427.014.html>. (in Chinese)
- [23] 范晴,谢芝勋,谢志勤,等. 可视化多重荧光 LAMP 鉴别诊断牛轮状病毒和产肠毒素性大肠杆菌的研究[J]. 中国兽医科学,2019,49(9):1119-1127.
- FAN Qing,XIE Zhi-xun,XIE Zhi-qing,*et al.* Development of multiplex fluorescence-based loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of bovine rotavirus and enterotoxigenic *E. coli* [J]. *Chinese Veterinary Science*,2019,49(9):1119-1127. (in Chinese)

(责任编辑 王艳华)