

DOI:10.13350/j.cjpb.220724

· 综述 ·

## 人感染布鲁氏菌检测方法的研究进展\*

侯水平,周勇,吴新伟,胡玉山\*\*

(广州市疾病预防控制中心微生物学检验部,广东广州 510440)

**【摘要】** 布鲁氏菌病是遍布全球 170 多个国家和地区的人兽共患传染病。人感染布鲁氏菌后临床表现多样,其诊断方法备受关注。近年来,免疫磁珠分离、飞行时间质谱鉴定以及宏基因组测序等新技术应用于对布鲁氏菌的检测。本文将对目前国内外对布鲁氏菌分离培养、生化鉴定、快速检测方法的研究进展进行阐述并比较其优缺点,为布鲁氏菌的实验室检测提供参考。

**【关键词】** 布鲁氏菌;检测方法;聚合酶链式反应;宏基因组测序;综述

**【中图分类号】** R384.1

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)07-0852-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jul.;17(7):852-856, 867.]

## The research progress of laboratory diagnostic methods of human brucellosis

HOU Shui-ping, ZHOU Yong, WU Xin-wei, HU Yu-shan (Guangzhou Center for Disease Control and Prevention Microbiology Laboratory, Guangzhou 510440, China)

**【Abstract】** Brucellosis is a worldwide zoonotic infection affecting more than 170 countries and regions. The clinical manifestations in humans are variable and unspecific, and the diagnostic method is always the focus of the research. New technologies such as magnetic beads isolation, MALDI-TOF MS and mNGS were explored in recent years. In this paper, we described the research progress of isolation culture, biochemical reaction and nucleic acid amplification and summarized the advantages and disadvantages, so as to provide reference for the laboratory detection of *Brucella*.

**【Key words】** Brucella; diagnostic method; polymerase chain reaction; metagenomic next-generation sequencing; review

\*\*\*布鲁氏菌病(简称布病)是指主要由牛、羊、猪等牲畜的肉、乳、皮毛等制品中含有的布鲁氏菌通过直接接触、呼吸道和消化道传染给人类的人兽共患传染病<sup>[1]</sup>。布鲁氏菌可分为 12 个种,其中有 9 个经典种:羊种、牛种、猪种、犬种、绵羊附睾种、沙林鼠种、鲸鱼种(*B. ceti*) 鳍脚目种(*B. pinnipedialis*) 和狒狒种(*B. papionis*);和 2 个非经典种:田鼠种(*Brucella microti*) 和歧见玛瑙宝螺种(*B. inopinata*) 以及新命名的赤狐种(*B. vulpis*)<sup>[2]</sup>。其中引起人类疾病的常为:羊种、牛种、猪种和犬种。羊种毒力最强,可引起人类严重的急性和慢性感染;牛种分布较广,引起的症状较轻;猪种感染率比前两种少,但血清型 1/3 可引起严重疾病;犬种引起人类疾病较少<sup>[3]</sup>。

布鲁氏菌感染后临床表现为发热、多汗、乏力、头痛、肝脾淋巴结肿大等,甚至累及泌尿生殖系统和中枢神经系统,临床表现多样,常缺乏特异性症状和体征,容易误诊和漏诊,如果没有及时治疗,容易发展为慢性而严重影响生活质量<sup>[4]</sup>。同时,布鲁氏菌能在空气中以气溶胶形式通过呼吸道吸入而造成感染<sup>[5]</sup>。因此对布病的正确诊断,对患者的及时治疗、预防慢性化具有重要作用;同时也为流行病学调查提供依据。本文对人感染布鲁氏菌病诊断方法的研究进展进行综述。

## 1 布鲁氏菌的分离培养方法

布鲁氏菌的分离培养是指从患者的血液、骨髓、脑脊液等样品中分离培养出布鲁氏菌,是诊断布鲁氏菌感染的金标准<sup>[6]</sup>。布鲁氏菌营养要求高,生长缓慢,分离时间长,尤其是刚从患者或者外环境新分离的初代培养物生长更缓慢,需要 3~8 d,有的甚至需要 20~30 d 后才能长出肉眼可见的小菌落<sup>[7-8]</sup>,

而实验室保存的菌株,常只需要 1~2 d 即可生长良好<sup>[9]</sup>。目前多采用以下几种方法进行分离培养:

**1.1 血培养方法** 在布鲁氏菌感染早期会出现菌血症,采集患者的血液或其他体液注入到血培养瓶中,再放入到自动化血培养仪中培养。Yagupsky 等<sup>[10]</sup>对商品化血培养瓶的培养时间进行研究,发现所有阳性标本均在 7 d 之内出现阳性。在对血培养瓶种类选择上,布鲁氏菌能在需氧瓶中生长而不能在厌氧瓶中生长<sup>[11]</sup>。当血培养仪提示有细菌生长时,抽取培养瓶内的液体到血平板、巧克力平板或布氏琼脂平板上 37 °C 培养,挑取可疑菌落进行鉴定。

**1.2 双相血培养瓶培养方法** 双相血培养瓶是由固相和液相组成,当液相培养液中有细菌繁殖时会在固相生长为菌落,以减少操作步骤和检测时间。由于牛种布鲁氏菌生长需要 5%~10% CO<sub>2</sub> 环境,因此常将双相血培养瓶放置在 CO<sub>2</sub> 养箱培养,培养时间常为 1~2 周,最长为 4 周。在 4 d 后即可在固相琼脂上发现细小布鲁氏菌菌落<sup>[12]</sup>,培养 13~18 d 才在琼脂表面长出小菌落<sup>[13-14]</sup>。

**1.3 选择性培养基** 对含有杂菌的标本如牛、羊奶等需要使

\* **【基金项目】** 广州市医学重点学科项目(No. 2021-2013-11),广州市重点实验室基础研究计划项目(No. 202102100001)。

\*\* **【通讯作者】** 胡玉山, E-mail: 444699748@qq.com

**【作者简介】** 侯水平(1981-),男,四川人,硕士研究生,副主任技师,主要从事病原微生物检测方面研究。  
E-mail: gzcdc367@163.com

用选择性培养基来抑制杂菌生长。选择性培养基常有三种组分:基础培养基、促生长因子和抑菌剂。基础培养基常为胰蛋白胨琼脂;促生长因子为牛/马的血清或脱纤维全血;抑菌剂包括使用万古霉素、林可霉素等抑制革兰阳性菌生长,使用多粘菌素 E、萘啶酸或多粘菌素 B 等抑制革兰阴性菌生长;两性霉素、茴香霉素等抑制真菌生长<sup>[15]</sup>。使用商品化试剂配制的选择性平板从牛奶中可检出布鲁氏菌<sup>[16]</sup>。为了防止细菌浓度过低而不能检出现象,将生牛奶经 6 000~7 000 r/min 离心 15 min,取残渣混合物涂布在选择性培养基上,经 CO<sub>2</sub> 培养 2 d 后即有可疑菌落生长<sup>[17]</sup>。

**1.4 免疫磁珠分离** 其原理将布鲁氏菌特异性抗体偶联在磁性微球上,形成免疫磁珠。磁珠可与待测样品中的布鲁氏菌结合形成布鲁氏菌-抗体-磁珠复合物,在磁场的作用下,免疫复合物与样品中的其他成分分离,磁珠上的布鲁氏菌可用于继续生化或核酸等鉴定实验。因此免疫磁珠分离方法常与 PCR、免疫荧光等检测技术结合。该技术与 PCR 相结合的检测限为 10<sup>5</sup> CFU/ml<sup>[18]</sup>,与量子点免疫荧光结合对布鲁氏菌的检测限低至 10<sup>3</sup> CFU/ml<sup>[19]</sup>。这种方法可从大量的样品中收集、浓缩特定病原体,同时减少样品中其他成分对病原体检测的干扰。

## 2 布鲁氏菌的鉴定方法

**2.1 常规染色** 布鲁氏菌在血平板上经 37 °C 培养 24 h 后菌落形态为:针尖样大小血膜;延长培养至 72 h 为圆形、凸起、边缘整齐、不溶血的较小菌落。在革兰染色下染色较弱,为阴性,无鞭毛、无芽胞,呈细沙状的球杆菌。柯氏染色法是鉴定布鲁氏菌的经典染色方法之一,布鲁氏菌经柯氏染色后,布鲁氏菌呈淡红色球杆菌,而其他菌体形态或生长特征相似的细菌(苍白杆菌和假苍白杆菌除外)均为蓝色,操作简单、便捷,常用于对布鲁氏菌的初步鉴定<sup>[20]</sup>。

**2.2 生化鉴定试验** 血培养阳性的培养物,在血平板上生长为小菌落,而在麦康凯平板不生长,氧化酶触酶阳性,吡啶试验阴性,尿素酶实验阳性,即可初步判定为布鲁氏菌<sup>[21]</sup>。布鲁氏菌有多个生物种以及某些生物种有多个生物型,可通过生化反应和单因子凝集实验进行区分(表 1)<sup>[22]</sup>。目前也有商品化生化鉴定卡可以实现培养和生化鉴定全自动完成。但自动生化鉴定的结果可能会与人苍白杆菌、动物溃疡伯格菌等菌发生混淆而造成误判<sup>[23]</sup>。

**2.3 飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)** 该技术是近年迅速发展和广泛应用的微生物快速鉴定技术,具有操作简单,快速,准确,高通量的特点。其原理是细菌和基质液混合形成共结晶,在激光和高压电场作用下,带电离子在真空管内快速移动从而获得样品的指纹图谱,并通过与数据库中的图谱进行对比从而确定样品的种属。该技术能实现对布鲁氏菌的准确快速鉴定,甚至通过聚类分群能把羊种、牛种和猪种进行区分<sup>[24-25]</sup>。但可能由于参照数据库不完善,在鉴定中也有将布鲁氏菌错误的鉴定为苍白杆菌的报道,因此如果质谱鉴定结果为苍白杆菌,可能该菌是布鲁氏菌<sup>[26-27]</sup>。在对布鲁氏菌涂靶板操作前,为避免活菌暴露,常需要挑取细菌到乙醇溶液中灭活后再进行实验操作。

## 3 布鲁氏菌感染的血清学诊断方法

**3.1 虎红平板凝集实验(RBT)** 琥红试验的原理是布鲁氏菌

细胞壁脂多糖(LPS)抗原和血清中相应的抗体结合而产生肉眼可见的凝集颗粒。该方法操作简单、灵敏高效,适合大规模样本的初筛。但是这种方法也可能与小肠结肠炎耶尔森菌 O:9 和大肠埃希菌 O157 等一些细菌产生交叉凝集反应而出现假阳性,因此初筛结果阳性后进行确证。

表 1 布鲁氏菌型的生化鉴定实验  
Table 1 Characters differentiating the nomen species and biovars of *Brucella*

种 Species	生物型 Biovar and biogroup	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	尿素酶 Urease	氧化酶 Oxidase	触酶 Catalase	复红染料 Basic fuchsin	硫堇 染料 Thionin	单项血清 Single anti-serum		
		需求实验 CO <sub>2</sub>	生长实验 H <sub>2</sub> S production						A	M	R
羊种	1	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
牛种*	1	(+)	+	+	+	+	+	-	+	-	-
	2	(+)	+	+	+	+	-	-	+	-	-
	3	(+)	+	+	(-)	+	+	+	+	-	-
	4	(+)	+	+	+	+	(+)	-	-	+	-
	5	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
猪种	9	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	1	-	+	+	+	+	(-)	+	+	-	-
	2	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	+	+	(-)	+	+	+	-
犬种	5	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
	-	-	-	+	+	+	(-)	+	-	-	+
绵羊 附睾种	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	
沙林 鼠种	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	

\*“+”表示为阳性,“-”表示为阴性,“(+)”表示多数为阳性,“(-)”表示多数为阴性;

\*“\*”以前认为牛种 7 型和 8 型是无效的,但后来恢复 7 型;“A”为牛种单因子血清,“M”羊种单因子血清,“R”为粗糙型血清。

**3.2 免疫层析技术(GICA)** 简称胶体金,将胶体金与抗人 IgM/IgG 结合在反应垫,把布鲁氏菌的 LPS 结合在硝酸纤维素膜上的检测线上,通过肉眼观察是否出现红色的检测线而判断样品中 IgM/IgG 阳性。该方法和试管凝集试验法在疫区、监测区和非疫区对比,发现这两种方法的阳性检出率差异无统计学意义<sup>[28]</sup>。该方法操作简单,反应快速,储存方便,适合基层筛查使用。

**3.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)** 为血清学检测中常用的一种方法,这种方法灵敏度高,特异性好。与琥红试验、胶体金和试管凝集试验区别是结果客观精确,避免了人为主观判断上的误差。使用 ELISA 方法和琥红试验对人群筛查,发现 ELSIA 方法检出的抗体阳性率高于琥红试验<sup>[29]</sup>。

**3.4 试管凝集试验(SAT)** 将待检血清对倍稀释多个稀释度后,与布鲁氏菌 LPS 溶液混合过夜培养后,观察管中凝集情况。发生凝集管底出现褶皱型沉淀且上层溶液澄清。以出现显著凝集并管内 50%澄清的稀释度为该血清样本的滴度。此方法操作较复杂,耗时较长,判读需要一定的经验;但该方法特异性好,是国内诊断布病的确诊方法之一。

**3.5 荧光偏振技术(FPA)** FPA 的原理是将荧光染料附着在小分子抗原或抗体片段上,当与样品中的相应抗体或抗原特异

性结合后,其旋转速率会变小,通过荧光偏振仪来测量旋转速率的变化从而检测样品中是否有相应的抗体或抗原的方法。Konstantinidis 等<sup>[30]</sup>将 230 名患者和 305 名健康者分别使用 FPA、SAT、RBPT 和 ELISA 进行检测, FPA 的灵敏度和特异度均高于其他 3 种方法。FPA 与传统的血清学诊断方法(RBPT 和 SAT)不同,所得的结果直接以偏振单位表示,减少了由于肉眼判断结果的主观影响。同时,对样本要求不高,可以对血清、血浆、全血甚至乳汁均可以检测。

**3.6 补体结合实验(CFT)** CFT 的原理是抗原和抗体结合形成抗原抗体复合物,抗体的 Fc 段可以与补体结合,当加入溶血素和红细胞时,由于无游离的补体因而不发生溶血现象。如果样品中无相应的抗体时,有游离的补体因而会发生溶血现象。目前认为布鲁氏菌抗体的这种检测方法,其特异性优于其他方法。但此方法操作复杂,限制了实验室的广泛应用。

**3.7 抗人免疫球蛋白实验(Coob's)** Coob'S 实验的原理在布病试管凝集实验中的可疑阳性或阴性的试管中加入抗人免疫球蛋白抗体,经 37 °C 孵育 20 h 后观察是否出现凝集现象,从而检测待检血清中是否含有不完全抗体从而出现“假阴性”的

结果。该方法灵敏度高,适合应用于对长期慢性患者或复发患者的检测,但对操作技术和设备有一定要求<sup>[31]</sup>。根据《WS269-2019 布鲁氏菌病诊断标准》,Coob's 实验在抗体滴度 1 : 400 及以上出现显著凝集即判定为阳性。

**4 布鲁氏菌的核酸检测方法**

分离出布鲁氏菌是诊断的金标准,但是该菌生长缓慢,生化试验周期长;同时涉及活菌操作存在生物安全风险,因此核酸检测技术得到广泛使用。

**4.1 聚合酶链式反应** 普通 PCR 最早是 Fekete 等在 1990 年使用 PCR 方法能特异性扩增布鲁氏菌外膜蛋白,但引物序列没有公开。Baily 等<sup>[32]</sup>在 1992 年公开设计的引物(B4/B5)能成功扩增布鲁氏菌的外膜蛋白 BCSP31 基因,此方法应用较广。随后也有选择 OMP2(JPF/JPR),OMP31(F/R)、BP26(26A/26B),16S rRNA(F4/R2),16S-23S rRNA 间隔区序列、IS711(I1/I2)作为靶基因/插入序列进行扩增检测。但靶基因/插入序列可能在某些生物种中缺失(如 OMP31 在牛种中缺失<sup>[33]</sup>)而导致假阴性,或与人苍白杆菌存在相同序列而出现假阳性(表 2)。

表 2 诊断布鲁氏菌感染常用的靶基因及引物序列  
Table 2 The target genes and primer sets used for *Brucella* DNA amplification

靶基因 Target genes	引物 Primer	序列(5'-3') Nucleotidesequence(5'-3')	扩增产物 长度(bp) Amplicon size (bp)	布鲁氏菌 种型验证 Confirmed by <i>Brucella</i> species	人苍白杆菌 验证 Confirmed by <i>Ochrobactrum</i> <i>anthropi</i>	参考 文献 refere nces
bcs31	B4	TGGCTCGGTTGCCAATATCAA	223	6 种 18 型验证均为阳性	人苍白杆菌有假阳性	[32,39]
	B5	CGCGCTTGCCCTTTCAGGTCTG				
16S rRNA	F4	TCGAGCGCCCGCAAG GGG	905	6 种 18 型验证均为阳性	人苍白杆菌 D 型有假阳性	[40]
	R2	AACCATAGTGTCTCCACTAA				
16S-23S 间隔区	ITS66	ACATAGATCGCAGCCAGTCA	214	6 种 18 型验证均为阳性	人苍白杆菌验证没有假阳性	[41]
	ITS279	AGATACCGACGCAAACGCTAC				
IS711	I1	TCAATCCAACACGTTC	52	5 种 14 型验证均为阳性	未使用人苍白杆菌验证	[42]
	I2	TCCTTGTACAGCTCC				
per	bruc1	CGG TTTAIGTGG ACTCICTCG	322	6 种 19 型验证均为阳性	人苍白杆菌验证没有假阳性	[43]
	bruc5	CAGTATTCTCGGTAGGCGAAGTA				
Omp2	JPf	GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA	193	5 种 18 型验证(猪种 2,3,4 型;犬种、绵羊附睾种阴性)	人苍白杆菌验证没有假阳性	[44]
	JPr	ACCAGCCATTGCGGTTCGGTA				
Omp31	F	TGGTAAGTCAAGTCTCGGTT	281	牛种缺失,未使用标准菌株验证	未使用人苍白杆菌验证	[45]
	R	CTTCTTCATTCCGTGTTCCGTG				
Bp26(omp28)	26A	GCCCCTGACATAACCCGCTT	1029 (1 900 bp 的是海洋哺乳动物源)	六种 18 型验证均阳性,海洋哺乳动物来源菌株为 1900bp	未使用人苍白杆菌验证	[46]
	26B	GAGCGTGACATTTGCCGATA				

巢式 PCR 和荧光 PCR 方法也应用于对布鲁氏菌的诊断,以提高检测的灵敏度。有研究证实,对临床样品使用巢式 PCR 首轮扩增的阳性率只有 4.5%(9/200),而次轮扩增阳性率可提高到 75%(151/200)<sup>[34]</sup>。荧光 PCR 方法操作简单,快速,与普通 PCR 进行比较,发现普通 PCR 扩增 BCSP31(B4/B5)对苍白杆菌会出现假阴性结果,而使用荧光 PCR 方法为阴性<sup>[35]</sup>。因此,荧光 PCR 其灵敏度和特异性均高于普通 PCR,在日常工作中应用最广泛<sup>[36]</sup>。

由于布鲁氏菌有羊种、牛种、猪种和犬种等多个种,每个种又有多个型别,因此使用多重 PCR 的方法来鉴别种属及型别,其中经典的就是 AMOS-PCR,可以同时鉴别羊种、牛种 1,2,4

型、猪种 1 型和绵羊附睾种<sup>[37]</sup>。尤其是 Lopez 等<sup>[38]</sup>来自西班牙等多个国家的 7 个实验室的学者使用不同区域和不同来源的 625 株布鲁氏菌,对含有 8 对引物多重 PCR 方法进行评估,发现此方法能根据不同长度的片段能同时区分 6 个经典生物种、3 种疫苗株和海洋哺乳动物来源的菌株。

**4.2 等温扩增技术** 环介导等温扩增技术(LAMP)是 notomi 等在 2000 年研发的一种针对目的基因设计 4 条引物,利用链置换 DNA 聚合酶在 60~65 °C 等温扩增 15~60 min 产物可增加至 10<sup>10</sup> 倍,并且反应产物可以通过肉眼观察或浊度仪检测的快速核酸检测技术<sup>[49]</sup>。Ohtsuki 等<sup>[50]</sup>使用此技术通过 BC-SP31 靶基因检测布鲁氏菌,并与荧光 PCR 的检出限进行比

较,发现这两种方法的检出限一致,但是 LAMP 方法的特异性更强,荧光 PCR 对 O1 型霍乱弧菌检测为假阳性,而 LAMP 方法对 O1 型霍乱弧菌没有出现假阳性。有研究使用此方法和巢式 PCR 对比,发现 LAMP 方法对布鲁氏菌的敏感性高,比巢式 PCR 高 10 倍<sup>[51]</sup>。

表 3 诊断布鲁氏菌的常用巢式 PCR 反应的引物序列  
Table 3 Nested PCR primer sets used for diagnosis of brucella

引物 Primer	序列(5'-3') Nucleotide sequence(5'-3')	扩增产物 长度(bp) Amplicon size	参考文献 References
BRU-P5	TCGAGAATTGGAAGAGGTC	726	
16S-23S 间隔区	BRU-P8 GCATAATGCGGCTTTAAGA BRU-P6 AAGAGGTCGGATTATCCG BRU-P7 CGAGCATTTCAGTCGAA	726 677 677	[47]
IS711	O1 TCCGCAAGCTCAAGCTTCTATCC O2 GGTGTCTGCATTCAAGTAACC I1 TCAATCCAACAGCTTCC I2 TCCTTGACAGCCTCC	325 52	[42]
BSCP31	Outer Primer F AAGGGCAAGGTGGAAGATT Outer Primer R CCTCGTCCAGAGAACCTTG Inner primer F GCGTA AGGATGCAAAACATCA Inner primer R AGATC GGAAC GAGCG AAATA	523 275	[34]

表 4 布鲁氏菌种型鉴定的常见多重 PCR 引物序列  
Table 4 Multiplex PCR primer sets used for diagnosis of brucella species

生物种/型 Biovar and biogroup	引物 Primer	序列(5'-3') Nucleotide sequence(5'-3')	扩增产物 长度(bp) Amplicon size(bp)	参考 文献 Refer ences	
AMOS -PCR	IS711 A M O S wboA bp26 omp31	TGCCATCACTTAAGGGCTTCAT GACGAACCGAATTTTCCAATCC AAATCGGTCCTTGCTGGTCTGA CGGTTCTGGCACCACTGTCG GGCGGTTTCTGAAGGTTCAGG ATCCTATTGCCCGGATAAGG GCTTCGATTTTCACTGTAGC GCGCATTCTCGGTTATGAA CGCAGCGGAAAAACAGCTATA TTTACACAGGCAATCCAGCA GCGTCCAGTTGTTGTGATG	- 498 731 961 285 1682 450(1320) 1071	[48]	
Bruce- Ladder PCR	犬种缺失 SI9 疫苗株缺 失 羊种和牛种缺 失 Rev.1 疫苗株 插入片段 沙林鼠种	Polysaccharide deacetylase eryC ABC transporter binding protein rpsL Transcription- al regulator	ACGCAGACACCTTCGGTAT TTTATCCATCGCCCTGTAC GCCGCTATTATGTGGACTGG AATGACTTCACGGTCTTCG GGAACACTACGCCACCTTGT GATGGAGCAAACGCTGAAG CAGGCAAACCTCAGAAGC GATGTGGTAACGCACACCAA CGCAGACAGTGACCATCAA GTATTCAGCCCCGTACCT	794 587 272 218 152	[38]

重组酶聚合酶等温扩增技术(RPA)是 Piepenburg 等在 2006 年开发的一种针对目的基因的两条特异性引物,在重组酶、单链结合蛋白和 DNA 聚合酶的催化作用下,在 37~42 °C 甚至在室温条件下即可扩增,在 20 min 内达到可检测水平<sup>[52]</sup>。与 LAMP 相比,退火温度更低,适于户外现场检测<sup>[53]</sup>。其它的

等温扩增技术如滚环扩增技术(RCA)、依赖核酸序列扩增技术(NASBA)等等温扩增技术尚未用于布鲁氏菌的检测。等温扩增技术具有灵敏度高、检测时间短和设备简单的优点,但应避免受到气溶胶污染而导致假阳性。

4.3 宏基因组测序技术 宏基因组测序不需病原体的纯培养物,而是通过高通量测序技术直接检测样品中所有微生物的核酸序列,从而探索样本中可能存在的致病微生物。与传统的检测方法相比,宏基因组测序技术能覆盖细菌、病毒、支原体、衣原体、立克次体、真菌和寄生虫等多种病原体<sup>[54]</sup>。Zhao 等<sup>[55]</sup>在 2020 年对 82 份骨关节感染的脓液标本使用宏基因组技术检测发现有 5 份标本中检出有羊种布鲁氏菌序列。Fan 等<sup>[56]</sup>对 4 名神经系统疾病患者脑脊液进行宏基因组测序技术检出 11~104 个布鲁氏菌特异性序列。随着测序技术的不断普及、标准化及测序成本的下降,该技术可能成为感染性疾病的常规诊断技术。

综上所述,布鲁氏菌常使用血培养或选择性培养基经对各类标本进行培养,免疫磁珠分离方法能尽量避免环境因素对布鲁氏菌培养造成的影响。可使用柯氏染色对可疑菌落快速筛查,也可使用全自动生化鉴定系统获得生化鉴定结果,飞行质谱鉴定技术能同时对菌落快速鉴定。核酸检测技术除 PCR 和等温 PCR 之外,宏基因组技术能获得样品中所有微生物信息,随着测序成本的降低及技术的完善,这项技术可在感染性疾病的诊断中广泛应用。

【参考文献】

[1] 杨丽. 山东省布鲁氏杆菌病流行特征及影响因素研究[D]. 济南: 山东大学,2015.  
[2] Scholz HC,Revilla-Fernandez S,Dahouk SA,et al. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*) [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*,2016,66(5):2090-2098.  
[3] 张文宏,张跃新. 布鲁菌病诊疗专家共识[J]. *中华传染病杂志*, 2017,35(12):705-710.  
[4] 施玉静. 人感染布鲁氏菌病临床特征及预后影响因素分析[D]. 北京:中国疾病预防控制中心,2017.  
[5] Pappas G,Panagopoulou P,Christou L,et al. *Brucella* as a biological weapon [J]. *Cell Mol Life Sci*,2006,63(19-20):2229-2236.  
[6] 刘佳音,姜海. 我国布鲁氏菌病诊断方法应用及思考[J]. *中华流行病学杂志*,2021,42(1):160-163.  
[7] 徐书显,曾亚平,陈崇智,等. 促布鲁氏菌生长的研究和 RE 促菌液的研制[J]. *传染病信息*,1994(2):68.  
[8] 王秀丽,蒋玉文,毛开荣,等. 布鲁氏菌病实验室诊断方法的研究进展[J]. *中国兽药杂志*,2011,5(11):37-42.  
[9] 姚静. 呼和浩特地区布鲁氏菌的分离鉴定[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2008.  
[10] Yagupsky P,Peled N,Press J,et al. Rapid detection of *Brucella melitensis* from blood cultures by a commercial system [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*,1997,16(8):605-607.  
[11] 欧内玉,冯慧. 研究布鲁菌血培养阳性在不同时间段的阳性率 [J]. *国际检验医学杂志*,2013,34(9):1199-1200.  
[12] 孙学东,田涛,马学平,等. 宁夏盐池县人体感染布鲁氏菌种型调查的研究 [J]. *宁夏医学杂志*,2015,37(11):1010-1012.

- [13] 刘武,李连升,崔步云,等. 甘肃省靖远县绵羊血液内分离的布鲁菌菌株种型鉴定[J]. 中华地方病学杂志,2017,36(12):870-873.
- [14] 刘武,李连升,崔步云,等. 甘肃省首例人源羊种3型布鲁菌的病原学特征研究[J]. 中华地方病学杂志,2018,37(3):212-217.
- [15] Hornsby R L, Jensen A E, Olsen S C, et al. Selective media for isolation of *Brucella abortus* strain RB51[J]. Vet Microbiol, 2000,73(1):51-60.
- [16] 易新萍,马晓菁,闫晶华,等. 牛乳样品中布鲁氏菌的分离和鉴定[J]. 中国预防兽医学报,2013,35(01):28-30.
- [17] 解英波,姚静,乌日罕,等. 内蒙地区牛乳中布鲁氏杆菌的分离鉴定[J]. 中国动物检疫,2008(02):31-32.
- [18] 苗玉强. 布鲁氏菌免疫磁珠及免疫荧光检测方法的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2016.
- [19] Song D, Qu X, Liu Y, et al. A rapid detection method of *Brucella* with quantum dots and magnetic beads conjugated with different polyclonal antibodies[J]. Nanoscale Res Lett, 2017,12(1):179.
- [20] 陈东科,陈丽,许宏涛. 柯氏染色法快速鉴别布鲁菌的方法学探讨[J]. 临床检验杂志,2015,33(11):805-807.
- [21] 郭素芳,王俊瑞,范文兵,等. 以血培养为基础的布鲁菌快速鉴定方法研究[J]. 中华地方病学杂志,2017,36(5):382-385.
- [22] Corbel MJ. Brucellosis in humans and animals[M]. World Health Organization, 2006:89.
- [23] 孙岩,杜雅楠,崔步云. 布鲁氏菌的分离、鉴定与分型技术研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2014,30(5):511-515.
- [24] 汤旭,肖迪,张慧芳,等. MALDI-TOF-MS 鉴定布鲁氏菌方法建立和评价[J]. 中国人兽共患病学报,2016,32(9):772-778.
- [25] Ferreira L, Vega CS, Sanchez-Juanes F, et al. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures[J]. PLoS One, 2010,5(12):e14235.
- [26] Khaliulina UT, Perera LA, Sahagun PJ, et al. [Identification of *Brucella melitensis* as *Ochrobactrum anthropi* by MALDI-TOF MS][J]. Rev Esp Quimioter, 2020,33(3):223-224.
- [27] Ahmed-Bentley J, Roman S, Mirzanejad Y, et al. Laboratory exposures from an unsuspected case of human infection with *Brucella canis*[J]. Emerg Infect Dis, 2021,27(9):2489-2491.
- [28] 朱明东,杨蓉,洪林娣,等. 胶体金免疫层析法在布鲁氏菌病不同流行地区的现场应用[J]. 疾病监测,2008,8(5):274-276.
- [29] Munyua P, Osoro E, Hunsperger E, et al. High incidence of human brucellosis in a rural Pastoralist community in Kenya, 2015[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2021,15(2):e9049.
- [30] Konstantinidis A, Minas A, Pournaras S, et al. Evaluation and comparison of fluorescence polarization assay with three of the currently used serological tests in diagnosis of human brucellosis[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2007,26(10):715-721.
- [31] 张文宏,张跃新. 布鲁菌病诊疗专家共识[J]. 中华传染病杂志, 2017,35(12):705-710.
- [32] Bailly GG, Krahn JB, Drasar BS, et al. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification[J]. J Trop Med Hyg, 1992,95(4):271-275.
- [33] Vizcaino N, Verger JM, Grayon M, et al. DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella spp.*: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers[J]. Microbiology (Reading), 1997,143(9):2913-2921.
- [34] 刘志国,王妙,塔娜,等. Nested-PCR 在人间布鲁氏菌病早期快速诊断中的探讨[J]. 中国人兽共患病学报,2021,37(2):188-192.
- [35] Bounaadja L, Albert D, Chenais B, et al. Real-time PCR for identification of *Brucella spp.*: a comparative study of IS711, bcspp31 and per target genes[J]. Vet Microbiol, 2009,137(1-2):156-164.
- [36] Al-ajlan HH, Ibrahim AS, Al-salamah AA. Comparison of different PCR methods for detection of *Brucella spp.* in human blood samples[J]. Pol J Microbiol, 2011,60(1):27-33.
- [37] 姜海,崔步云,赵鸿雁,等. AMOS-PCR 对布鲁氏菌种型鉴定的应用[J]. 中国人兽共患病学报,2009,25(2):107-109.
- [38] Lopez-Goni I, Garcia-Yoldi D, Marin CM, et al. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains[J]. J Clin Microbiol, 2008,46(10):3484-3487.
- [39] Da CM, Guillou JP, Garin-Bastuji B, et al. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification[J]. J Appl Bacteriol, 1996,81(3):267-275.
- [40] Romero C, Gamazo C, Pardo M, et al. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR[J]. J Clin Microbiol, 1995,33(3):615-617.
- [41] Keid LB, Soares RM, Vieira NR, et al. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer[J]. Vet Res Commun, 2007,31(8):951-965.
- [42] Al NA, Wright SG, Mustafa AS, et al. Single-tube, nested PCR for the diagnosis of human brucellosis in Kuwait[J]. Ann Trop Med Parasitol, 2002,96(4):397-403.
- [43] Bogdanovich T, Skurnik M, Lubeck P S, et al. Validated 5' nuclease PCR assay for rapid identification of the genus *Brucella* [J]. J Clin Microbiol, 2004,42(5):2261-2263.
- [44] Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Lopez-merino A, et al. Single-step PCR for detection of *Brucella spp.* from blood and milk of infected animals[J]. J Clin Microbiol, 1995,33(12):3087-3090.
- [45] Kattar MM, Zalloua PA, ARAJ GF, et al. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007,59(1):23-32.
- [46] Cloeckert A, Grayon M, Grepinet O. An IS711 element downstream of the bp26 gene is a specific marker of *Brucella spp.* isolated from marine mammals[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000,7(5):835-839.
- [47] Rijpens NP, Jannes G, Van Asbroeck M, et al. Direct detection of *Brucella spp.* in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes[J]. Appl Environ Microbiol, 1996,62(5):1683-1688.
- [48] Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR[J]. J Clin Microbiol, 1994,32(11):2660-2666.
- [49] 戴婷婷,陆辰晨,郑小波. 环介导等温扩增技术在病原物检测上的应用研究进展[J]. 南京农业大学学报,2015,38(5):695-703.

- tion[J]. Pathogens, 2021, 10(4):468.
- [49] Diop F, Vial T, Ferraris P, et al. Zika virus infection modulates the metabolomic profile of microglial cells. PLoS One, 2018, 13(10):e0206093.
- [50] Chen Q, Gouilly J, Ferrat YJ, et al. Metabolic reprogramming by Zika virus provokes inflammation in human placenta[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):2967.
- [51] Melo CFOR, Delafiori J, de Oliveira DN, et al. Serum metabolic alterations upon Zika infection[J]. Front Microbiol, 2017(8):1954.
- [52] Roe B, Kensicki E, Mohny R, et al. Metabolomic profile of hepatitis C virus-infected hepatocytes[J]. PLoS One, 2011, 6(8):e23641.
- [53] Gilany K, Mohamadkhani A, Chashmian S, et al. Metabolomics analysis of the saliva in patients with chronic hepatitis B using nuclear magnetic resonance; a pilot study[J]. Iran J Basic Med Sci, 2019, 22(9):1044-1049.
- [54] Wang JB, Pu SB, Sun Y, et al. Metabolomic profiling of autoimmune hepatitis: The diagnostic utility of nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. J Proteome Res, 2014, 13(8):3792-3801.
- [55] Dittarot K, Jittornam P, Wilairat P, et al. Urinary metabolomic profiling in chronic hepatitis B viral infection using gas chromatography/mass spectrometry[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19(3):741-748.
- [56] Raijmakers RPH, Roerink ME, Jansen AFM, et al. Multi-omics examination of Q fever fatigue syndrome identifies similarities with chronic fatigue syndrome[J]. J Transl Med, 2020, 18(1):448.
- [57] 魏文峰, 褚衍涛, 刘焯, 等. 基于超高效液相色谱-飞行时间质谱技术的肺炎支原体感染小鼠血清代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7):1382-1389.
- [58] Li J, Luu LDW, Wang X, et al. Metabolomic analysis reveals potential biomarkers and the underlying pathogenesis involved in *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia[J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1):593-605.
- [59] Kumar A, Misra BB. Challenges and opportunities in cancer metabolomics[J]. Proteomics, 2019, 19(21-22):e1900042.
- 【收稿日期】 2022-03-05 【修回日期】 2022-05-17

(上接 856 页)

- [50] Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, et al. Rapid detection of *Brucella spp.* by the loop-mediated isothermal amplification method [J]. J Appl Microbiol, 2008, 104(6):1815-1823.
- [51] 蔺国珍. 布鲁氏菌病 LAMP 检测方法的建立及双基因共表达分子疫苗研究[D]. 中国农业科学院, 2012.
- [52] 秦雪, 付世骞, 杨鑫焱, 等. 重组酶聚合酶等温扩增技术在食源性致病菌检测中的应用[J]. 食品工业科技, 2020; 1-12.
- [53] Ren H, Yang M, Zhang G, et al. Development of a rapid recombinase polymerase amplification assay for detection of *Brucella* in blood samples[J]. Mol Cell Probes, 2016, 30(2):122-124.
- [54] 戴媛媛, 马筱玲. 宏基因组二代测序技术在临床病原学诊断中的应用[J]. 临床检验杂志, 2021, 39(1):1-5.
- [55] Zhao M, Tang K, Liu F, et al. Metagenomic Next-generation sequencing improves diagnosis of osteoarticular infections from abscess specimens; a multicenter retrospective study[J]. Front Microbiol, 2020(11):2034.
- [56] Fan S, Ren H, Wei Y, et al. Next-generation sequencing of the cerebrospinal fluid in the diagnosis of neurobrucellosis[J]. Int J Infect Dis, 2018(67):20-24.
- 【收稿日期】 2022-02-18 【修回日期】 2022-05-08

(上接 861 页)

- [34] Kip E, Naze F, Suin V, et al. Impact of caspase-1/11, -3, -7, or IL-1 $\beta$ /IL-18 deficiency on rabies virus-induced macrophage cell death and onset of disease[J]. Cell Death Discov, 2017(3):17012.
- [35] Koraka P, Martina BEE, van den Ham HJ, et al. Analysis of mouse brain transcriptome after experimental Duvhage virus infection shows activation of innate immune response and pyroptotic cell death pathway[J]. Front Microbiol, 2018(9):397.
- [36] Koraka P, Martina BEE, Smreczak M, et al. Inhibition of caspase-1 prolongs survival of mice infected with rabies virus[J]. Vaccine, 2019, 37(33):4681-4685.
- [37] Martina BEE, Smreczak M, Orłowska A, et al. Combination drug treatment prolongs survival of experimentally infected mice with silver-haired bat rabies virus[J]. Vaccine, 2019, 37(33):4736-4742.
- [38] Yogarajah T, Ong KC, Perera D, et al. AIM2 Inflammasome-mediated pyroptosis in Enterovirus A71-infected neuronal cells restricts viral replication[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):5845.
- [39] Wang H, Lei X, Xiao X, et al. Reciprocal regulation between Enterovirus 71 and the NLRP3 inflammasome[J]. Cell Rep, 2015, 12(1):42-48.
- [40] Lei X, Zhang Z, Xiao X, et al. Enterovirus 71 Inhibits pyroptosis through cleavage of gasdermin D[J]. J Virol, 2017, 91(18):e01069-17.
- [41] Bai J, Chen X, Liu Q, et al. Characteristics of enterovirus 71-induced cell death and genome scanning to identify viral genes involved in virus-induced cell apoptosis[J]. Virus Res, 2019(265):104-114.
- 【收稿日期】 2022-02-27 【修回日期】 2022-05-12