

布病脊柱炎致病机制、分型及实验室检查研究进展

杨亚峰, 赵岩*

内蒙古医科大学第二附属医院脊柱外科, 内蒙古 呼和浩特

收稿日期: 2024年7月29日; 录用日期: 2024年8月21日; 发布日期: 2024年8月30日

摘要

布鲁氏杆菌病(Brucellosis)是由布鲁杆菌引起的以动物为传染源的人畜共患病。布鲁氏菌感染人体后可累及多器官、多系统, 其中骨关节系统病变为其最常见并发症, 且常见于脊柱。布氏杆菌性脊柱炎又称布病脊柱炎(*Brucella Spondylitis*, BS), 是由布鲁氏菌侵犯脊柱(椎间盘、椎体、肌肉)导致的脊柱感染性疾病, 约占布病患者的2%~53%。主要临床表现为发热、乏力、夜间盗汗、厌食、头痛、肝脾肿大、关节疼痛、腰背痛等全身及局部症状。本文旨在深入阐述BS的致病机制、分型技术及实验室检查的最新进展。

关键词

布鲁氏杆菌, 脊柱炎, 致病机制, 分型技术, 实验室检查

Research Progress on the Pathogenesis, Classification and Laboratory Examination of *Brucella Spondylitis*

Yafeng Yang, Yan Zhao*

Spinal Surgery Department, The Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia

Received: Jul. 29th, 2024; accepted: Aug. 21st, 2024; published: Aug. 30th, 2024

Abstract

Brucellosis is a zoonotic disease caused by *Brucella*, which is transmitted from animals. *Brucella*

*通讯作者。

infection in the human body can affect multiple organs and systems, among which bone and joint system lesions are the most common complications, and are common in the spine. *Brucella spondylitis*, also known as *brucella spondylitis* (BS), is a spinal infectious diseases caused by *brucella* invading the spine (intervertebral disc, vertebral body, muscle), accounting for 2% to 53% of patients with brucellosis. The main clinical manifestations include fever, fatigue, night sweats, anorexia, headache, hepatosplenomegaly, joint pain, lower back pain, and other systemic and local symptoms. This article aims to provide an in-depth explanation of the pathogenesis, typing techniques, and latest developments in laboratory testing of BS.

Keywords

***Brucella*, Spondylitis, Pathogenic Mechanism, Typing Techniques, Laboratory Examination**

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 流行病学

布鲁氏杆菌病(Brucellosis)简称布病, 又称波状热、马耳他热、地中海热、弛张热, 是由布鲁氏菌引起的人畜共患系统性慢性传染病, 每年报告新发病例约 50 万[1]。布鲁氏菌病的病原体属于布鲁氏菌属, 是 α 变形杆菌类的非运动性革兰氏阴性和兼性细胞内病原体。布鲁氏菌属包括六个物种, 每个物种都按其 主要宿主分类: *B. melitensis* (绵羊和山羊)、*B. abortus* (牛)、*B. suis* (猪)、*B. ovis* (绵羊)、*B. canis* (狗)和 *B. neotomae* (森林沙漠鼠)。*B. melitensis* 是人类中毒性最强的细菌。近年来, 已成功分离出几个新物种, 包括 *B. inopinata* (来自人类)、*B. pinnipedialis*、*B. ceti* (来自水生动物)和 *B. microti* (来自普通田鼠), 将数量扩大到 10 种[2]。

2. 临床表现

布鲁氏菌性脊柱炎的临床表现多样, 且缺乏特异性, 主要临床表现为发热、乏力、夜间盗汗、厌食、头痛、肝脾肿大、关节疼痛、腰背痛等全身及局部症状。其中发热为最常见的症状, 其次是肌肉疼痛、乏力、关节疼痛及出汗[3]。

3. 致病机制

布鲁氏菌病的发病机制错综复杂, 涉及细菌侵袭宿主细胞、免疫逃避和慢性感染[4]。布鲁氏菌独特地渗透并持续存在于宿主细胞(如巨噬细胞)内, 并绕过宿主免疫防御, 导致长期感染。

3.1. ABO 血型与布鲁氏菌易感性

ABO 血型抗原是人组织血型抗原(HBGAs), 除红细胞表面外, 广泛存在于呼吸道、消化道和生殖器的粘膜上皮细胞表面, 也可在唾液、胃液、牛奶等分泌物中以游离低聚糖的形式存在。它们的不同表达可增加或减少宿主对多种病原微生物的易感性, 在感染的发生和发展中起重要作用。研究发现, AB 型血人群比 O 型血人群更易感染布鲁氏菌, 感染可能性为其 6.26 倍, 且 AB 血型患者淋巴细胞最高, B 血型患者淋巴细胞最低, A 型血的患者比 O 型血的患者更容易发生肝损伤, 对于这种差异, 目前存在以下推测, 1) 可能是由于 AB 型血和 B 型血患者对布鲁氏菌的免疫反应不同; 2) 由于 AB 血型的人体内缺乏 A 抗体和 B 抗体, 造成了布鲁氏菌的易感性; 3) 布鲁氏菌脂多糖壁的表位可能与 AB 型人血型抗原多糖链

的表位存在相似性, 这可能使 AB 血型的人对布鲁氏菌病产生相对耐受性, 因此即使少量的布鲁氏菌也可能导致这些个体的疾病发展[5] [6]。

3.2. AIM2、ASC、NLRP3、Caspase-1 与炎症起始

当布鲁氏菌感染人体后, 巨噬细胞通过模式识别受体(PRR)识别布鲁氏菌, 这些受体激活 ASC 炎症小体(主要为 AIM2 和 NLRP3), 同时布鲁氏菌利用 IV 型分泌系统(T4SS)将效应蛋白或 DNA 转位到宿主胞质溶胶中, 进一步激活炎症小体, 进而触发促炎细胞因子的产生, 导致随后的 I 型免疫反应, 这对于布鲁氏菌清除和感染控制至关重要。黑色素瘤缺乏因子 2 (AIM2)或 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3)可以通过 ASC 募集 Caspase-1 前体(pro-Caspase-1)来激活含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1 (Caspase-1), 活性 Caspase-1 随后发挥作用, 将 IL-1 细胞因子切割成其生物活性形式 IL-1 β 和 IL-18, 并触发称为焦亡的程序性炎症细胞死亡。AIM2 是一种胞质双链 DNA 受体, 负责激活对 DNA 病毒和细胞内细菌的炎症和宿主免疫反应。AIM2 通过其 HIN200 结构域与布鲁氏菌 DNA 结合, 并与 ASC 寡聚, 从而启动 Caspase-1 激活炎症小体的形成。布鲁氏菌感染宿主细胞可产生内质网应激, 诱导线粒体活性氧(ROS)的增加, 从而激活 NLRP3, NLRP3-ASC 复合物通过 ASC 的 CARD 结构域与 pro-Caspase-1 相互作用, pro-Caspase-1 的募集通过邻近机制诱导激活 caspase-1 [7] [8]。最近的一项针对炎症小体在急性和慢性布鲁氏菌病患者外周血样本中的表达水平的研究发现, 与健康对照组相比, 急性布鲁氏菌病患者的 AIM2 表达显著升高, ASC 表达显著降低, NLRP3 无显著变化, 但 Caspase-1 呈增加趋势; 慢性布鲁氏菌病患者 NLRP3 呈增加趋势, AIM2 表达显著降低, Caspase-1 表达显著升高, ASC 无显著变化, 这些变化可能提示布鲁氏菌在人类中免疫逃逸的机制[9]。

目前, 布鲁氏菌感染导致的骨损伤机制尚不明确。布鲁氏菌感染引起的骨关节炎既存在细菌的直接作用, 也存在免疫系统引发的炎症性质的免疫病理过程[10]。长期以来, 成骨细胞在细菌引起的骨关节疾病的病理过程中起核心作用。成骨细胞不仅是骨形成细胞, 也是破骨细胞发育的动态控制者。成骨细胞负责骨基质的沉积, 被认为有助于骨钙化和矿化。破骨细胞是唯一的骨吸收细胞, 通过酸化和溶酶体酶的释放来驱动骨的再吸收[11]。

3.3. OPG/RANK/RANKL 与骨吸收、骨破坏

在骨重塑过程中, OPG/RANK/RANKL 分子三位一体的成员彼此紧密相连, 核因子- κ B 受体活化因子配体(RANKL)和骨保护素(OPG)之间的平衡在骨病理生理中起着至关重要的作用[12]。RANKL 是一种同源三聚体蛋白, 主要由成骨细胞、免疫细胞和一些癌细胞以膜或可溶性形式合成。该因子对通过破骨细胞生成和成熟破骨细胞的激活介导骨吸收至关重要。RANKL 通过与位于破骨细胞(前体和成熟细胞)上的细胞表面受体 RANK 结合, 刺激破骨细胞生成和破骨细胞活性, 与细胞外 RANK 的结合导致参与破骨细胞形成和存活的特定信号通路的激活, 从而导致骨吸收[13] [14]。研究发现, 布鲁氏菌感染诱导成骨细胞凋亡, 并抑制细胞的矿物质和有机基质沉积, 通过 p38 和 ERK1/2 MAPK 途径激活诱导 RANKL 表达。OPG 由成骨细胞产生, 并作为 RANKL 的可溶性诱骗受体。OPG 通过与 RANKL 相互作用, 抑制 RANKL 与 RANK 的结合, 从而阻止 RANK 激活和随后的破骨细胞生成, 从而抑制骨吸收[15] [16]。骨重建受 OPG 和 RANKL 的严格控制, OPG/RANKL 的比值被认为能更好地反映环境信号。高比例的 OPG/RANKL 有利于骨形成, 低比例的 OPG/RANKL 有利于骨吸收[17]。

3.4. MMPs 与骨细胞凋亡

MMPs (基质金属蛋白酶)不储存于正常组织中, 或在正常组织中组成表达很少, 其生产和活动受到高度管制, 但 MMPs 在骨、关节发生炎症时起到重要的作用, 其主要来源是炎症浸润细胞。MMPs 受生长

因子、细胞因子和细胞外基质(ECM)成分的转录调节。布鲁氏菌感染通过 p38/MAPK 通路影响 MMPs 分泌及成骨细胞凋亡, 抑制 GM-CSF 时, MMPs 的分泌也得到抑制; 其中 MMP-2 和 MMP-9 (分别为明胶酶 A 和 B)可以降解多种胶原蛋白, 包括基底膜(IV 型胶原蛋白)、变性的纤维状 I 型胶原蛋白(明胶)和 V 型胶原蛋白[18][19]。Maida [20]等人通过测定布病患者及健康者外周血中 MMPs 水平的研究中发现: 布病合并有骨关节并发症患者中的血清 MMPs (MMP-1, MMP-9, MMP-13)水平最高, 且血清样品中 MMPs 的表达与关节炎活动性参数相关, 在适当的抗生素治疗后, 血清 MMPs 水平迅速下降, 其水平可以作为监测治疗效率的可靠技术。最近的一项研究发现, 流产布鲁氏菌导致的髌前滑囊炎患者的滑液中存在高水平的明胶酶活性, 通过联免疫吸附试验(ELISA)发现其中存在高水平的 MMP-9, 这也进一步证实 MMP 参与布鲁氏菌感染相关的骨关节损伤。在炎症反应过程中, 宿主不能迅速清除感染时, 免疫反应的有效激活以及相关的高水平细胞因子会导致关节破坏。高浓度的细胞因子会增加宿主基质金属蛋白酶(MMP)的释放, 这些金属蛋白酶会降解胶原蛋白, 从而导致软骨损失[21]。

3.5. Cx43 与骨损伤

Cx43(连接蛋白 43)是骨细胞中主要的间隙连接蛋白, 它促进了维持骨细胞活力所需的细胞信号之间的细胞信号通信[22]。布鲁氏菌感染骨细胞后会降低 CX43 的表达, Ayelen [23]等人的研究表明: 脱氢表雄酮(DHEA)处理能够逆转流产布鲁氏菌感染对 Cx43 表达的抑制作用; 此外, 在皮质醇存在的情况下进行感染实验时, DHEA 逆转了流产布鲁氏菌感染对 Cx43 表达的影响, 添加脱氢表雄酮或其衍生物的抗生素治疗可以被认为是一种新的治疗布鲁氏菌病所导致的骨损伤和后遗症的可能方法。

3.6. CXCR3、CXCL9 和 CXCL10 与炎症损伤

当布鲁氏菌侵入人体时, 它会唤醒免疫细胞并产生趋化因子, 趋化因子受体和配体的相互作用在白细胞向免疫反应位点的迁移中发挥了重要作用。C-X-C 基序趋化因子受体 3 (CXCR3)主要在 Th1 淋巴细胞上表达, 其激动剂 C-X-C 基序趋化因子配体 9 (CXCL9)、C-X-C 基序趋化因子配体 10 (CXCL10)是 IFN- γ 诱导的促进 Th1 反应的趋化因子。据报道, CXCR3 及其配体(CXCL9 和 CXCL10)在 BS 患者的外周血及受布鲁氏菌感染的组织中均高度表达, 且受布鲁氏菌感染组织中高浓度的 CXCL10 会募集 CXCR3 免疫细胞来调节病变组织周围的免疫反应, 从而加重 BS 患者的炎症损伤程度[24][25]。

4. 分型技术

目前, 我国布病防控形势依旧严峻, 追溯分析对于确定布病感染的起源和传播方式、制定适当的控制措施以防止传染原进一步传播具有重要意义。但布鲁氏菌种间 DNA 同源性高, 分型方法的区分能力有限, 这给布鲁氏菌病流行病学起源的调查和布鲁氏菌分离株的分型研究带来了挑战。

4.1. 多位点可变数串联重复分析(MLVA)分型技术

布鲁氏菌的多位点可变数串联重复分析(MLVA)分型技术是利用整个基因组的几个位点上的串联重复(VNTRs) DNA 序列的数量中所存在的差异而为布鲁氏菌进行分型。串联重复序列(也被称为迷你卫星或微卫星)存在于基因内和基因外位点, 可能影响蛋白质的表达或结构, 因此 MLVA 技术具有很强的物种鉴定能力和判别能力; 其次, MLVA 技术具有良好的分型能力、可重复性、稳定性、歧视性和流行病学一致性, 因此有助于布鲁氏菌病的监测和控制, 揭示不同地区的优势基因型; 最后, MLVA 分型技术还可以将本地分离株与全球数据库进行比较, 以便进行系统的地理学研究。具有相似 MLVA 谱的动物和人类布鲁氏菌基因型的存在表明该病原体可能从反刍动物向人类传播。目前, 布鲁氏菌病 MLVA 基因分型是利用 MLVA-8、MLVA-10、MLVA-11、MLVA-15、MLVA-16 和 MLVA-21 位点的重复序列进行的

[26]-[28]。基于 PCR 的 MLVA 分型技术是近年来布鲁氏菌分型中使用最广泛的方法。目前研究发现, 基于全基因组测序(WGS)的 MLVA 分型技术与基于 PCR 的 MLVA-16 分型技术表现出较高的一致性, 这可以有效避免过去数十年中的大量遗传数据的丢失[29]。

4.2. 多位点序列(MLST)分型技术

布鲁氏菌的多位点序列(MLST)分型技术使用等位基因作为比较单位, 通过对特定的管家基因(通常为 9 或 21 个)的测序确定。MLST 分型技术可以为任何新的或正在出现的布鲁氏菌菌株的分型提供一个框架[30]。目前布鲁氏菌 MLST 分型主要利用 MLST-9、MLST-21 两种分型方案, 在中国, 已经应用 MLST 方法鉴定了 18 种已知的 ST 类型, 并分析了中国流行的布鲁氏菌基因型的分布[31]。据报道, MLVA 与 MLST 在布鲁氏菌物种鉴别水平上是一致的, 但对于基因类型, MLST 表现出较低的分辨率[32]。cgMLST 是一种基于一组预定义核心基因的 WGS 基因分型系统, 一方面, 与传统 MLST 方法相比, 它提供了更高的分辨率; 另一方面, cgMLST 使得在不同临床实验室中建立统一的布鲁氏菌基因分型方法成为可能, 目前, 已有研究建立了一个统一的 cgMLST 方案来表征人类和动物中所有致病性布鲁氏菌物种; 另外, cgMLST 具有很高的鉴别能力, 因此可以解决布病暴发中密切相关的布鲁氏菌菌株, 并可用于致病性布鲁氏菌的流行病学监测[33]。

4.3. 单核苷酸多态性(SNP)分析

单核苷酸多态性(SNP)分析是根据 SNP 序列变异与基因组中编码序列的关系以及它们如何改变编码序列和影响基因产物从而对布鲁氏菌相关 SNP 序列进行分类的一项技术, 这极大的有助于深入了解布鲁氏菌分离株的基因组结构[34]。SNP 分析可以在基因组的编码和非编码区域中发现其多态性, 因此其具有极高的分辨力。目前, SNP 分析已成功用于区分布鲁氏菌物种, 并绘制布鲁氏菌的地理分布和全球传播图[35]。相较于 MLVA-16 分型技术, cgSNP (核心基因组单核苷酸多态性)分析可以可靠地用于确定和跟踪布鲁氏杆菌的爆发菌株, MLVA-16 分型技术对不同分离株具有较高的分辨能力, 但对爆发菌株的定义和追踪具有误导性。这是由于微卫星容易发生同型发育, 即易发生多重突变和相关的标记趋同, 这意味着基于 MLVA 标记拷贝数的特定基因型可以在不同位置出现不止一次, 甚至可以在实验室的传代培养中出现, 这使得爆发分析和追踪爆发菌株的传播变得不可靠。但 SNP 非常稳定, 只要省略单核苷酸重复或 rRNA 序列等高度重复的 SNP, 就被认为具有系统发育特征[36]。

4.4. 全基因组测序(WGS)

全基因组测序(WGS)是通过研究布鲁氏菌菌株的全部遗传信息, 揭示其系统发育相关性并更深入地解析基因型, 因此具有高度的辨别力, 并可以准确揭示布鲁氏菌传播途径和暴发毒株的来源[37]。另外, WGS 可以帮助阐明抗生素耐药性的可能分子机制, 并确定参与抗生素转运和灭活的基因。已有研究通过对几个与外排泵(即 RND、ABC 和 MFS)相关的抗性基因进行测序, 发现这些基因是内在和部分获得性抗生素产生耐药性的重要机制, 即布鲁氏菌对头孢菌素的抗生素耐药性可能主要与外排泵有关, 而不是 β -内酰胺酶基因; 这为进一步开发针对特定外排泵的特定抑制剂从而降低抗生素耐药性提供了依据[38]。

5. 实验室检查

5.1. 细菌培养

细菌培养被认为是布鲁氏菌病实验室诊断的“金标准”。在 BS 的初始阶段, 患者会经历持续的低级别菌血症, 因此抽取外周血培养(BC)可以轻松得到布鲁氏菌。目前应用的 BC 方法包括手动单相和双相

方法、基于裂解的血培养(将标本接种到固体培养基上之前裂解血液样本中所含的白细胞)、血凝块培养物(培养含有吞噬生物体的白细胞被捕获的血凝块)以及自动化血培养系统。随着感染的进展,微生物从血液中取出并进入巨噬细胞,循环细菌浓度降低,这使得其分离变得困难。此时也可以选取骨髓、脑脊液、关节液、组织(肝脏、淋巴结等)和尿液作为标本。其结果会受微生物变量(即布鲁氏菌属)、患者相关变量(例如年龄、症状持续时间、急性或慢性和局灶性疾病、首次感染或复发以及抗生素使用)和方法相关变量(例如血容量、收集的 BC 瓶数、使用的 BC 系统、潜伏时间和盲法传代培养的效果)的影响[39] [40]。

5.2. 血清学检测

目前我国诊断布病共有以下几种,目前最常用的血清学检测仍为虎红平板凝集试验法(rose bengal plate agglutination test, RBT)与试管凝集试验法(serum agglutination test, SAT)。

1) 虎红平板凝集试验法:虎红平板凝集试验(RBT)的主要检测项目是 IgG 抗体,此方法具有操作简单、成本低、速度快等特点,在大规模普查中有着重要的应用价值。反应强度标准如下:①“-”无凝集,为均匀粉红色。②“++”出现明显卷边,凝集块间液体稍清亮。③“+++”凝集反应较强。④“++++”凝集块呈菌丛状,凝集块间液体清亮明显。但 RBT 结果易受到非特异性抗体的干扰,使诊断结果受到影响,出现假阴性结果。因此需要应用 SAT 进行复核[41]-[43]。

2) 试管凝集试验法:试管凝集试验法(SAT)是针对 IgM 类抗体进行检测,IgM 抗体是五聚体,可促进抗体和细胞之间的聚集,从而引起管内凝集。在中国,SAT 阳性标准抗体最低滴度为 1:100。研究发现,在 BS 患者中,IgG 平均值随病程延长而波动,IgM 平均值呈下降趋势,也就意味着随着病情的进展,RBT 假阴性(-)结果逐渐增加,SAT 阳性结果呈逐步下降趋势,因而 IgM 水平有利于布鲁氏菌病的早期诊断,而 IgG 水平有助于布鲁氏菌病分期的判断[43] [44]。

3) 荧光偏振免疫测定:荧光偏振免疫测定(FPA)的原理是测量溶液中用荧光染料标记的小抗原分子与其抗体偶联的相同抗原分子之间的旋转速度差异,FPA 非常适用于布鲁氏菌患者的检测以及布鲁氏菌病风险人群的个体检测和大规模现场筛选和监测,其优点是反应时间仅为 5 分钟;此外,与传统测试不同,FPA 的数据是通过电子方式获得的。因此,消除了主观性,取而代之的是快速分析、永久记录和轻松的数据分散。FPA 测试结果以毫微米偏振单位(mP)表示;检出值 < 72 mP 为阴性,72~93 mP 为可疑,>93 mP 为阳性[45] [46]。

4) 酶联免疫吸附实验:酶联免疫吸附实验(ELISA)是诊断布氏菌病最有效的检测方法,具有较高的敏感性和特异性。ELISA 对 IgG 的敏感性要高于 IgM,对 IgG 和 IgM 又有着很高的联合特异性,因此建议同时检测 IgG 和 IgM [47]。以纸为固相载体的 p-ELISA 方法是在传统 ELISA 方法的基础上发展起来的新技术。与传统的 ELISA 方法相比,p-ELISA 速度更快,所需试剂更少,无需专用仪器[48]。布鲁氏菌感染人体后,由于多表位蛋白抗原的特异性要高于 LPS,因此基于多表位融合蛋白的 p-ELISA 方法可以作为布鲁氏菌病的确诊方法。据报道,FPA 或 ELISA 等检测可消除与小肠结肠炎 Y.O9 和大肠杆菌 O157 相关的交叉反应性[49] [50]。

5) 布鲁氏菌 Coombs 凝胶试验:布鲁氏菌 Coombs 凝胶试验(BCGT)可作为一种敏感性较高的筛选方法,其原理与用于血型测定的凝胶系统相似,若血清中存在布鲁氏菌抗体,抗原和抗体将保持为凝胶上的粉红色复合物。利用 BCGT 可以发现生活在布鲁氏菌病流行地区的慢性布鲁氏菌病或再感染和复发的患者中存在的阻断抗体,即 IgG (IgG1 和 IgG2)和 IgA 抗体[51]。

6) 补体结合试验:补体结合试验(CFT)对布鲁氏菌有很高的敏感性和特异性,是国际公认的血清学诊断方法。CFT 主要的补体结合抗体为免疫球蛋白 IgG1。其原理为当抗体与相应的抗原相结合而形成复合物时,抗体的分子构型改变,处于 Fc 段上的补体结合位点暴露,这时补体与之结合,结合的补体不再

游离。但 CFT 操作繁琐, 需要经验丰富的技术人员, 因此可作为确认试验的布鲁氏菌病检测方案[52]。

7) 胶体免疫层析法: 胶体免疫层析法(GICA)是以胶体金作为示踪标志物, 应用于抗原抗体反应中的一种新型免疫标记技术。GICA 在诊断人布鲁氏菌病中特异性和敏感性都较高, 且 GICA 法操作简单, 容易掌握, 结果快速, 不需要特殊仪器, 适合于布鲁菌病监测地区的现场应用[53]。

5.3. 分子生物学检测

1) 实时荧光定量 PCR: 实时荧光定量 PCR (qPCR)是常规 PCR 的进一步发展, 相较普通 PCR, 其主要优点为操作简单, 耗时少, 不需要电泳分析, 可以减少操作中病原体的接触, 有效降低生物安全风险, 且可同时进行大批量检测[54]。研究发现, 基于 IS711、bcsp31 基因以及 OMP31 基因的 TaqMan 探针 PCR 方法具有简单、快速、灵敏度和特异性高等优点。且与血清相比, 全血更适合基于 qPCR 的布鲁氏菌病的诊断, 因为在全血中存在更高的目标 DNA 负载, 假阳性或结果误读的几率较低[55] [56]。

2) 巢式 PCR: 巢式 PCR (Nested PCR)用于需要提高 PCR 的灵敏度和/或特异性的情况。巢式 PCR 通常涉及两个连续扩增反应, 通过使用两对寡核苷酸可以执行更多的循环, 从而提高 PCR 的灵敏度。两组单独的引物与同一靶标模板的结合有助于提高 PCR 的特异性[57]。研究发现[58], 与血培养相比, 巢式 PCR 的灵敏度和特异性为 100%, 且虽然血清中 DNA 提取过程更容易, 但全血巢式 PCR 具有更高的灵敏度。值得注意的是, 当布鲁氏菌血液中呈阴性时, 不宜再用巢式 PCR。田国忠[59]的研究表明, 巢式 PCR 可用于布鲁氏菌 DNA 的检测和分型, 包括临床菌株和血液标本的检测和分型。

3) 微滴式数字 PCR: 微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)是一种将微流体技术与基于 Taq-Man 的 PCR 相结合的新型检测方法。与传统的 PCR 方法相比, ddPCR 更加灵敏, 最低检测限达到单个拷贝, 不需要依赖 Ct 值和标准曲线而实现绝对核酸定量, 特异性强, 9 株不同种属的布鲁氏菌菌株均能被检测到, 可重复性高; 且与大肠杆菌 O:157 菌株等其他 4 种细菌均无交叉反应。但由于其昂贵的价格以及商业仪器和主混合试剂的不可用性, 其在临床环境中的广泛应用仍有待推广[60] [61]。

4) 环介导等温核酸扩增: 环介导等温核酸扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种在等温条件下进行基因扩增的新方法, 简单易行, 无需高度复杂的热循环设备, 所有链置换反应都发生在等温条件下, 因此具有较高的扩增效率。LAMP 反应需要 4 个引物(两个内引物, 两个外引物)识别目标 DNA 上的 6 个不同区域, 因此特异性极高。LAMP 检测的灵敏度比 PCR 高 10~100 倍, 检测限为 10 个拷贝或更少模板, 也就意味着, LAMP 试验可用于 BS 早期或 BS 临床症状不明显时的诊断。且与 PCR 相比, 我们可以肉眼直接观察到 LAMP 结果, 从而消除了电泳研究的必要性。由于 LAMP 的简单, 快速, 可视性, 极高的灵敏度和特异性, 使其成为 PCR 的良好替代品[62] [63]。Li 等人[64]的研究将环介导的等温扩增与基于纳米颗粒的侧向流动生物传感器(LAMP-LFB)相结合, 发现 LAMP-LFB 可以快速鉴定所有布鲁氏菌菌株, 并可用作基础、临床和现场实验室中 BS 的潜在诊断工具。

5) miRNA: 布鲁氏菌对宿主免疫系统的主要逃避机制是抑制补体途径和 Toll 样受体(TLR)信号通路, 干扰 CD4 阳性 T 淋巴细胞的有效抗原呈递, 选择性颠覆自噬途径, 抑制树突状细胞刺激, 抑制自噬溶酶体融合和巨噬细胞凋亡。目前已发现多种 miRNA (包括 miR-125b-5p、miR-21-5p、miR-23b、miR-155、miR-301a-3p、miR-183-5p、miR-130a-3p、miR-146a、miR-199a-3p、miR-181a-5P 和 miR-351-5p)在布鲁氏菌病的免疫发病机制中发挥作用[65] [66]。Zhang 等人的研究发现, miR-15a-3p、miR-7-2-3p、miR-103b 在布鲁氏菌病患者血清样本中的表达显著升高, 其中 miR103b 可作为布鲁氏菌病检测的血清生物标志物[67]。最新的一项研究发现[68]: miR-21 可能是诊断急性布鲁氏菌病的潜在辅助生物标志物, 监测 miR-21 水平有助于疾病的早期发现和诊断; miR-21 的表达增强可以通过选择性靶向与免疫应答负调控相关的基因来有益地调节免疫应答, 因此被认为是布鲁氏菌病的潜在治疗靶点。

6. 小结与展望

我国布鲁氏菌病及布鲁氏菌性脊柱炎的发病一直居高不下, 目前各地区对布鲁氏菌病的认识仍不足, 该研究归纳和总结了近年来我国及国际领域针对 BS 的致病机制、分子分型以及实验室检查的观点, 希望能够对一线临床工作及更深层次的研究有所帮助。

参考文献

- [1] Jiao, H., Zhou, Z., Li, B., Xiao, Y., Li, M., Zeng, H., *et al.* (2021) The Mechanism of Facultative Intracellular Parasitism of *Brucella*. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, Article 3673. <https://doi.org/10.3390/ijms22073673>
- [2] Qureshi, K.A., Parvez, A., Fahmy, N.A., Abdel Hady, B.H., Kumar, S., Ganguly, A., *et al.* (2023) Brucellosis: Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment—a Comprehensive Review. *Annals of Medicine*, **55**, Article ID: 2295398. <https://doi.org/10.1080/07853890.2023.2295398>
- [3] 地里下提·阿不力孜, 范俊, 马良. 布鲁氏菌性脊柱炎诊断及治疗专家共识[J]. 中国防痨杂志, 2022, 44(6): 531-538.
- [4] Serafino, A., Bertinat, Y.A., Bueno, J., Pittaluga, J.R., Birnberg Weiss, F., Milillo, M.A., *et al.* (2024) Beyond Its Preferential Niche: *Brucella Abortus* RNA Down-Modulates the IFN- γ -Induced MHC-I Expression in Epithelial and Endothelial Cells. *PLOS ONE*, **19**, e0306429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0306429>
- [5] Mohsenpour, B., Hajibagheri, K., Afrasiabian, S., Ghaderi, E. and Ghasembegloo, S. (2015) ABO Blood Groups and Susceptibility to Brucellosis. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **68**, 124-127. <https://doi.org/10.7883/yoken.jiid.2014.185>
- [6] Su, L., Cao, Y., Liu, Y., Zhang, J. and Zhang, G. (2022) Analysis of Clinical Characteristics and Blood Cell in Adult Patients with *Brucella* Bloodstream Infection of Different Blood Groups. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, **39**, 429-434. <https://doi.org/10.1007/s12288-022-01617-y>
- [7] Marim, F.M., Franco, M.M.C., Gomes, M.T.R., Miraglia, M.C., Giambartolomei, G.H. and Oliveira, S.C. (2016) The Role of NLRP3 and AIM2 in Inflammasome Activation during *Brucella Abortus* Infection. *Seminars in Immunopathology*, **39**, 215-223. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0581-1>
- [8] Costa Franco, M.M.S., Marim, F.M., Alves-Silva, J., Cerqueira, D., Rungue, M., Tavares, I.P., *et al.* (2019) AIM2 Senses *Brucella Abortus* DNA in Dendritic Cells to Induce Il-1 β Secretion, Pyroptosis and Resistance to Bacterial Infection in Mice. *Microbes and Infection*, **21**, 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.09.001>
- [9] Su, X., Zhao, S. and Song, Y. (2022) Expression of NLRP3 and AIM2 Inflammasome in Peripheral Blood in Chinese Patients with Acute and Chronic Brucellosis. *Scientific Reports*, **12**, Article No. 15123. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19398-9>
- [10] Abu Nowar, H., Al Dalahmeh, A., Alrabadi, M., Jabali, S., Kakich, M., Alqsous, N., *et al.* (2024) Exploring the Complex Landscape of Spine Brucellosis. *Cureus*, **16**, e51761. <https://doi.org/10.7759/cureus.51761>
- [11] Chen, X., Wang, Z., Duan, N., Zhu, G., Schwarz, E.M. and Xie, C. (2017) Osteoblast-Osteoclast Interactions. *Connective Tissue Research*, **59**, 99-107. <https://doi.org/10.1080/03008207.2017.1290085>
- [12] Udagawa, N., Koide, M., Nakamura, M., Nakamichi, Y., Yamashita, T., Uehara, S., *et al.* (2020) Osteoclast Differentiation by RANKL and OPG Signaling Pathways. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, **39**, 19-26. <https://doi.org/10.1007/s00774-020-01162-6>
- [13] Yasuda, H. (2021) Discovery of the RANKL/RANK/OPG System. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, **39**, 2-11. <https://doi.org/10.1007/s00774-020-01175-1>
- [14] Hooshiar, S.H., Tobeiha, M. and Jafarnejad, S. (2022) Soy Isoflavones and Bone Health: Focus on the RANKL/RANK/OPG Pathway. *BioMed Research International*, **2022**, Article ID: 8862278. <https://doi.org/10.1155/2022/8862278>
- [15] 程增玉, 姜雯, 徐浩东, 等. 基于核因子- κ B 受体活化因子受体/骨保护素探讨复方雷公藤外敷剂改善II型胶原诱导型关节炎模型大鼠骨破坏[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2023, 31(2): 12-17, 23.
- [16] Ono, T., Hayashi, M., Sasaki, F. and Nakashima, T. (2020) RANKL Biology: Bone Metabolism, the Immune System, and Beyond. *Inflammation and Regeneration*, **40**, Article No. 2. <https://doi.org/10.1186/s41232-019-0111-3>
- [17] Tobeiha, M., Moghadasian, M.H., Amin, N. and Jafarnejad, S. (2020) RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. *BioMed Research International*, **2020**, Article ID: 6910312. <https://doi.org/10.1155/2020/6910312>
- [18] 王鑫, 丁家波. 布鲁氏菌病关节炎的致病机制研究进展[J]. 生命科学, 2020, 32(11): 1237-1242.

- [19] Giambartolomei, G.H., Arriola Benitez, P.C. and Delpino, M.V. (2017) *Brucella* and Osteoarticular Cell Activation: Partners in Crime. *Frontiers in Microbiology*, **8**, Article 256. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00256>
- [20] Šiširak, M. (2015) Osteoarticular Complications of Brucellosis: The Diagnostic Value and Importance of Detection Matrix Metalloproteinases. *Acta Medica Academica*, **44**, 1-9. <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.121>
- [21] Mixon, A., Savage, A., Bahar-Moni, A.S., Adouni, M. and Faisal, T. (2021) An *in Vitro* Investigation to Understand the Synergistic Role of Mmps-1 and 9 on Articular Cartilage Biomechanical Properties. *Scientific Reports*, **11**, Article No. 14409. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93744-1>
- [22] Pesce Viglietti, A.I., Arriola Benitez, P.C., Gentilini, M.V., Velásquez, L.N., Fossati, C.A., Giambartolomei, G.H., *et al.* (2016) *Brucella* Abortus Invasion of Osteocytes Modulates Connexin 43 and Integrin Expression and Induces Osteoclastogenesis via Receptor Activator of NF- κ B Ligand and Tumor Necrosis Factor α Secretion. *Infection and Immunity*, **84**, 11-20. <https://doi.org/10.1128/iai.01049-15>
- [23] Pesce Viglietti, A.I., Giambartolomei, G.H. and Delpino, M.V. (2019) Endocrine Modulation of *Brucella* Abortus-Infected Osteocytes Function and Osteoclastogenesis via Modulation of RANKL/OPG. *Microbes and Infection*, **21**, 287-295. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.01.004>
- [24] Hu, X., Shang, X., Wang, L., Fan, J., Wang, Y., Lv, J., *et al.* (2020) The Role of CXCR3 and Its Ligands Expression in *Brucellar* Spondylitis. *BMC Immunology*, **21**, Article No. 59. <https://doi.org/10.1186/s12865-020-00390-9>
- [25] Hassanshahi, F., Noroozi Karimabad, M., Miranzadeh, E., Hassanshahi, G., Torabizadeh, S.A. and Jebali, A. (2023) The Serum Level of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 and the Expression of CXCR3 of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Brucellosis Patients. *Current Microbiology*, **80**, Article No. 201. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03230-2>
- [26] Kumari, G., Doimari, S., Suman Kumar, M., Singh, M. and Singh, D.K. (2021) MLVA Typing of *Brucella melitensis* and *B. Abortus* Isolates of Animal and Human Origin from India. *Animal Biotechnology*, **34**, 375-383. <https://doi.org/10.1080/10495398.2021.1971685>
- [27] Akar, K. and Erganis, O. (2022) Evaluation of the Genetic Profiles of *Brucella melitensis* Strain from Turkey Using Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) and Multilocus Sequence Typing (MLST) Techniques. *Veterinary Microbiology*, **269**, Article ID: 109423. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109423>
- [28] Özmen, M., Özgen, E.K., Sayı, O., Karadeniz Pütür, E., Okumuş, B., İba Yılmaz, S., *et al.* (2023) Genotyping of *Brucella* Isolates from Animals and Humans by Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **96**, Article ID: 101981. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.101981>
- [29] Pelerito, A., Nunes, A., Grilo, T., Isidro, J., Silva, C., Ferreira, A.C., *et al.* (2021) Genetic Characterization of *Brucella* Spp.: Whole Genome Sequencing-Based Approach for the Determination of Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Profiles. *Frontiers in Microbiology*, **12**, Article 740068. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.740068>
- [30] Shome, R., Krithiga, N., Shankaranarayana, P.B., Jegadesan, S., Udayakumar S, V., Shome, B.R., *et al.* (2016) Genotyping of Indian Antigenic, Vaccine, and Field *Brucella* spp. Using Multilocus Sequence Typing. *The Journal of Infection in Developing Countries*, **10**, 237-244. <https://doi.org/10.3855/jidc.6617>
- [31] Piao, D., Liu, X., Di, D., Xiao, P., Zhao, Z., Xu, L., *et al.* (2018) Genetic Polymorphisms Identify in Species/Biovars of *Brucella* Isolated in China between 1953 and 2013 by MLST. *BMC Microbiology*, **18**, Article No. 7. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1149-0>
- [32] Tan, Q., Wang, Y., Liu, Y., Tao, Z., Yu, C., Huang, Y., *et al.* (2023) Molecular Epidemiological Characteristics of *Brucella* in Guizhou Province, China, from 2009 to 2021. *Frontiers in Microbiology*, **14**, Article 1188469. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1188469>
- [33] Abdel-Glil, M.Y., Thomas, P., Brandt, C., Melzer, F., Subbaiyan, A., Chaudhuri, P., *et al.* (2022) Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for Improved Characterization and Epidemiological Surveillance of Pathogenic *Brucella*. *Journal of Clinical Microbiology*, **60**, e0031122. <https://doi.org/10.1128/jcm.00311-22>
- [34] Khan, A., Melzer, F., Sayour, A., Shell, W., Linde, J., Abdel-Glil, M., *et al.* (2021) Whole-Genome Sequencing for Tracing the Genetic Diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Isolated from Livestock in Egypt. *Pathogens*, **10**, Article 759. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060759>
- [35] Janowicz, A., De Massis, F., Ancora, M., Cammà, C., Patavino, C., Battisti, A., *et al.* (2018) Core Genome Multilocus Sequence Typing and Single Nucleotide Polymorphism Analysis in the Epidemiology of *Brucella melitensis* Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, **56**, e00517-18. <https://doi.org/10.1128/jcm.00517-18>
- [36] Holzer, K., Wareth, G., El-Diasty, M., Abdel-Hamid, N.H., Hamdy, M.E.R., Moustafa, S.A., *et al.* (2022) Tracking the Distribution, Genetic Diversity and Lineage of *Brucella melitensis* Recovered from Humans and Animals in Egypt Based on Core-Genome SNP Analysis and *in Silico* MLVA-16. *Transboundary and Emerging Diseases*, **69**, 3952-3963. <https://doi.org/10.1111/tbed.14768>
- [37] Dadar, M., Brangsch, H., Alamian, S., Neubauer, H. and Wareth, G. (2023) Whole-Genome Sequencing for Genetic

- Diversity Analysis of Iranian *Brucella* Spp. Isolated from Humans and Livestock. *One Health*, **16**, Article ID: 100483. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100483>
- [38] Ma, H., Xu, H., Wang, X., Bu, Z., Yao, T., Zheng, Z., *et al.* (2023) Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibility of Human *Brucella* in Northeast China. *Frontiers in Microbiology*, **14**, Article 1137932. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1137932>
- [39] Di Bonaventura, G., Angeletti, S., Ianni, A., Petitti, T. and Gherardi, G. (2021) Microbiological Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis: An Overview. *Pathogens*, **10**, Article 1623. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121623>
- [40] Yagupsky, P., Morata, P. and Colmenero, J.D. (2019) Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **33**, e00073-19. <https://doi.org/10.1128/cmr.00073-19>
- [41] 宋利桃, 尉瑞平, 米景川, 等. 布鲁菌病三种血清学检测方法一致性研究[J]. 医学动物防制, 2021, 37(1): 68-70, 74.
- [42] 魏娜. 虎红平板凝集试验与试管凝集试验检测人布鲁菌病抗体的应用探讨[J]. 中国医药指南, 2022, 20(6): 104-106.
- [43] 高玉芬, 李淑慧, 杜晓敏. 试管凝集试验与虎红平板凝集试验对布鲁氏杆菌病的诊断价值[J]. 临床医学研究与实践, 2021, 6(5): 114-115, 118.
- [44] Ta, N., Yu, R., Liang, H., Zhang, W., Song, L., Fan, M., *et al.* (2022) Analysis of Laboratory and Serological Test Results in Patients with Acute Brucellosis during Follow-Up. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **36**, e24205. <https://doi.org/10.1002/jcla.24205>
- [45] Dong, S., Xiao, D., Liu, J., Bi, H., Zheng, Z., Wang, L., *et al.* (2021) Fluorescence Polarization Assay Improves the Rapid Detection of Human Brucellosis in China. *Infectious Diseases of Poverty*, **10**, Article No. 46. <https://doi.org/10.1186/s40249-021-00834-3>
- [46] Suo, B., He, J., Wu, C. and Wang, D. (2021) Comparison of Different Laboratory Methods for Clinical Detection of *Brucella* Infection. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **172**, 223-227. <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05367-1>
- [47] Xu, N., Wang, W., Chen, F., Li, W. and Wang, G. (2020) ELISA Is Superior to Bacterial Culture and Agglutination Test in the Diagnosis of Brucellosis in an Endemic Area in China. *BMC Infectious Diseases*, **20**, Article No. 11. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4729-1>
- [48] Pang, B., Zhao, C., Li, L., Song, X., Xu, K., Wang, J., *et al.* (2018) Development of a Low-Cost Paper-Based ELISA Method for Rapid Escherichia Coli O157: H7 Detection. *Analytical Biochemistry*, **542**, 58-62. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.11.010>
- [49] Yin, D., Bai, Q., Wu, X., Li, H., Shao, J., Sun, M., *et al.* (2021) A Multi-Epitope Fusion Protein-Based P-Elisa Method for Diagnosing Bovine and Goat Brucellosis. *Frontiers in Veterinary Science*, **8**, Article 708008. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.708008>
- [50] Yin, D., Bai, Q., Wu, X., Li, H., Shao, J., Sun, M., *et al.* (2021) Paper-Based ELISA Diagnosis Technology for Human Brucellosis Based on a Multiepitope Fusion Protein. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **15**, e0009695. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009695>
- [51] Koçman, E.E., Erensoy, M.S., Taşbakan, M. and Çiçeklioğlu, M. (2018) Comparison of Standard Agglutination Tests, Enzyme Immunoassay, and Coombs Gel Test Used in Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis. *Turkish Journal of Medical Sciences*, **48**, 62-67. <https://doi.org/10.3906/sag-1707-122>
- [52] 沈红霞, 倪柏锋, 王彬, 等. 动物布鲁氏菌病抗体补体结合试验与cELISA检测结果比较[J]. 浙江畜牧兽医, 2021, 46(1): 1-4.
- [53] 王淑云, 刘熹, 荣蓉, 等. 五种布鲁菌血清学检测方法对比分析[J]. 中华预防医学杂志, 2016, 50(2): 175-178.
- [54] 巫秀红, 刘庆斌, 张永红, 等. 布鲁氏菌荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 北京农学院学报, 2021, 36(3): 78-82.
- [55] Becker, G.N. and Tuon, F.F. (2021) Comparative Study of IS711 and Bcsp31-Based Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Diagnosis of Human Brucellosis in Whole Blood and Serum Samples. *Journal of Microbiological Methods*, **183**, Article ID: 106182. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106182>
- [56] Abdel-Hamid, N.H., Beleta, E.I.M., Kelany, M.A., Ismail, R.I., Shalaby, N.A. and Khafagi, M.H.M. (2021) Validation of Real-Time Polymerase Chain Reaction versus Conventional Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Brucellosis in Cattle Sera. *Veterinary World*, **14**, 144-154. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.144-154>
- [57] Green, M.R. and Sambrook, J. (2019) Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, No. 2. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>
- [58] Rahbarnia, L., Farajnia, S., Naghili, B., *et al.* (2021) Comparative Evaluation of Nested Polymerase Chain Reaction for Rapid Diagnosis of Human Brucellosis. *Archives of Razi Institute*, **76**, 203-211.

- [59] Tian, G.Z. (2021) A Nested-Polymerase Chain Reaction Assay to Identify and Genotype *Brucella*. *Biomedical and Environmental Sciences*, **34**, 227-231.
- [60] Chen, B., Jiang, Y., Cao, X., Liu, C., Zhang, N. and Shi, D. (2021) Droplet Digital PCR as an Emerging Tool in Detecting Pathogens Nucleic Acids in Infectious Diseases. *Clinica Chimica Acta*, **517**, 156-161. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.02.008>
- [61] 梅力, 王英超, 程汝佳, 等. 1 种布鲁氏菌微滴式数字 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(6): 1753-1759.
- [62] Huang, T., Li, L., Liu, X., Chen, Q., Fang, X., Kong, J., *et al.* (2020) Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique: Principle, Development and Wide Application in Food Safety. *Analytical Methods*, **12**, 5551-5561. <https://doi.org/10.1039/d0ay01768j>
- [63] Moeini-Zanjani, A., Pournajaf, A., Ferdosi-Shahandashti, E., Gholami, M., Masjedian, F., Khafri, S., *et al.* (2020) Comparison of Loop-Mediated Isothermal Amplification and Conventional PCR Tests for Diagnosis of Common *Brucella* Species. *BMC Research Notes*, **13**, Article No. 533. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05377-8>
- [64] Li, S., Liu, Y., Wang, Y., Chen, H., Liu, C. and Wang, Y. (2019) lateral Flow Biosensor Combined with Loop-Mediated Isothermal Amplification for Simple, Rapid, Sensitive, and Reliable Detection of *Brucella* Spp. *Infection and Drug Resistance*, **12**, 2343-2353. <https://doi.org/10.2147/idr.s211644>
- [65] 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.
- [66] Kazemi, S., Mirzaei, R., Sholeh, M., Karampoor, S., Keramat, F., Saidijam, M., *et al.* (2021) microRNAs in Human Brucellosis: A Promising Therapeutic Approach and Biomarker for Diagnosis and Treatment. *Immunity, Inflammation and Disease*, **9**, 1209-1218. <https://doi.org/10.1002/iid3.519>
- [67] Zhang, C., Fu, Q., Ding, M., Chen, T., Lu, X., Zhong, Y., *et al.* (2019) Comprehensive Analysis of Differentially Expressed Serum Micrnas in Humans Responding to *Brucella* Infection. *Annals of Translational Medicine*, **7**, 301-301. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.05.74>
- [68] Rezaeepoor, M., Keramat, F., Jourghasemi, S., Rahmanpour, M., Lipsa, A., Hajilooi, M., *et al.* (2024) MicroRNA-21 Expression as an Auxiliary Diagnostic Biomarker of Acute Brucellosis. *Molecular Biology Reports*, **51**, Article No. 264. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-09193-8>