

数字 PCR 和荧光定量 PCR 诊断 急性期布鲁菌病的灵敏度比较初步研究

韩冰, 吴翠萍, 赵蕊, 刘贵明, 蒋荣猛

[摘要] **目的** 建立用于布鲁菌检测的数字 PCR 技术, 初步用小样本开展研究, 比较数字 PCR 和荧光定量 PCR 的灵敏度差异, 验证数字 PCR 作为急性期布鲁菌病诊断技术的可行性。**方法** 选取符合我国急性期布鲁菌病诊断标准的 20 例患者的血清标本, 分别用数字 PCR 和荧光定量 PCR 技术进行检测, 初步比较 2 者在急性期布鲁菌病诊断中的灵敏度差异, 并分析差异原因。**结果** 20 例急性期布鲁菌病患者血清样本中, 数字 PCR 检测阳性 20 例, 荧光定量 PCR 检测阳性 0 例。**结论** 初步证实急性期布鲁菌病患者血清标本检测中, 数字 PCR 检测灵敏度高于荧光定量 PCR, 有良好的临床应用前景, 但也存在一定局限性, 尚须进一步扩大样本完成实验诊断技术临床研究, 并进行多实验室验证。

[关键词] 布鲁菌; 数字 PCR; 荧光定量 PCR; 诊断

[中国图书资料分类号] R516.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-8134(2019)04-0312-05

DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2019.04.006

A preliminary study on the sensitivity of digital PCR and fluorescence quantitative PCR in the diagnosis of acute brucellosis

HAN Bing, WU Cui-ping, ZHAO Xin, LIU Gui-ming, JIANG Rong-meng*

Department 2 of Infection, Beijing Ditan Hospital Affiliated to Capital Medical University, 100015, China

Department of Infection, Weifang Yidu Central Hospital, 262500, China

HAN Bing and WU Cui-ping are the first authors who contributed equally to the article

* Corresponding author, E-mail: 13911900791@163.com

[Abstract] **Objective** A digital PCR technology for detection of *Brucella* was established. A preliminary study was carried out with small samples. To compared the sensitivity differences between digital PCR and fluorescence quantitative PCR and verify the feasibility of digital PCR as a diagnostic technique for acute brucellosis. **Methods** Serum samples from 20 patients who met the diagnostic criteria of acute brucellosis in China were detected by digital PCR and fluorescent quantitative PCR respectively. The sensitivity differences between the 2 methods in the diagnosis of acute brucellosis were preliminarily compared, and the reasons of the differences were analyzed. **Results** Among the 20 serum samples from patients with acute brucellosis, 20 were positive by digital PCR and 0 by fluorescent quantitative PCR. **Conclusions** It is preliminarily confirmed that the sensitivity of digital PCR is higher than that of fluorescent quantitative PCR in the detection of serum samples from patients with acute brucellosis. It has good clinical application prospects, but it also has some limitations. It is necessary to further expand the sample to complete the clinical research of experimental diagnosis and carry out multi-laboratory validation.

[Key words] *Brucella*; digital PCR; fluorescent quantitative PCR; diagnosis

布鲁菌病是由布鲁菌感染导致人畜共患疾病, 主要以发热、大汗、关节痛、肝脾大和慢性化为特征, 在全球均有流行, 我国主要集中于新疆、内蒙古、黑龙江、甘肃、宁夏等牧区, 但随着畜牧业和交通运输业的发展, 病例逐渐向城市扩散, 北京地区病例逐年增加。布鲁菌病诊断主要依靠分离培养、抗体检测和核酸检测。布鲁菌血培养阳性率低, 且存在安全性问题, 临床应用受限。抗体检测技术在临床应用最广, 但是缺乏大样本临床研究, 导致具有诊断意义的抗体滴度存在争论, 比如, 关于布鲁菌病急性期试管凝集试验诊

断标准, 我国与 WHO 推荐的不一致, 我国推荐试管凝集试验 (standard tube agglutination test, SAT) 滴度 $\geq 1:100$, WHO 推荐 SAT 滴度 $\geq 1:160$ 。荧光定量 PCR 检测技术在海外证实灵敏度和特异度较高, 被美国 CDC 推荐用于布鲁菌病诊断。但是, 荧光定量 PCR 技术在我国应用可能存在两方面问题, 一是我国布鲁菌病患者从发病到诊断时间较长, 部分患者诊断前应用抗生素进行治疗, 国内常用的头孢类和喹诺酮类抗生素治疗布鲁菌病有效, 导致菌血症存在时间短, 布鲁菌核酸血清含量低, 荧光定量 PCR 临床研究结果可能和国外研究存在差异。二是荧光定量 PCR 受到 PCR 抑制物、标准品质量和标准曲线偏倚的影响, 导致室内质量评价依从性差, 不同实验室间检测结果可比性差。数字 PCR 技术为绝对定量技术, 检测灵敏度优于荧光定量 PCR 技术, 在各实验室之间具有高度可重复性, 在海外已被作为 HIV 和 HBV 病毒载

[基金项目] 北京市属医院科研培育计划 (PX2016019, PX2019065);

首都医科大学附属北京地坛医院内科研基金项目 (DTQL201801)

[作者单位] 100015, 首都医科大学附属北京地坛医院感染二科 (韩冰、蒋荣猛); 100097, 北京农业生物技术研究中心基因组测序及大数据挖掘课题组 (赵蕊、刘贵明); 262500, 潍坊益都中心医院感染科 (吴翠萍)

前两位作者对本文有同等贡献, 均为第一作者

[通信作者] 蒋荣猛, E-mail: 13911900791@163.com

量临床检测技术。本研究拟建立用于布鲁菌检测的数字PCR技术, 先期选取20例符合急性期布鲁菌病诊断标准的患者血清样本进行小样本研究, 初步比较数字PCR与荧光定量PCR检测布鲁菌的灵敏度差异, 并分析原因, 为后续开展大样本实验室诊断技术提供参考, 现介绍如下。

1 材料与方法

1.1 材料 血清标本来源于2018年4—8月就诊于潍坊益都中心医院的急性期布鲁菌病患者, 阳性对照菌为中国CDC布鲁菌病实验室捐赠。急性期定义为符合布鲁菌病诊断标准, 病程6个月以内^[1]。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 主要试剂 Qubit dsDNA assay kit (Q32853, Invitrogen)、ddPCR Supermix for Probes (no dUTP) (186-3024, Bio-Rad)、ddPCR Droplet Reader Oil (186-3004, Bio-Rad)、Droplet Generation Oil for Probes (1863005, Bio-Rad)、Taqman Fast Advanced Master Mix (4444963, Applied Biosystems)、5 min TA/Blunt-Zero Cloning kit (C601-01, Vazyme)、DH5 α Competent cell (CW0808S, 康为世纪)、QIAprep mini kit (27104, QIAGEN)

1.2.2 主要仪器 桌面小型离心机 (CUBEE, 台湾CUBEE)、涡旋振荡器 (Vortex 5, 其林贝尔)、Qubit 3.0 荧光定量仪 (Qubit3.0, Invitrogen)、微量移液枪 (Eppendorf)、QX200™ Droplet Digital™ PCR System (QX200, Bio-Rad)、Bio-Rad T100 PCR 仪 (T100, Bio-Rad)、PX1 封膜仪 (PX1, Bio-rad)、-20 °C 冰箱 (BD-226W, 青岛海尔)、Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪 (CFX 96, Bio-Rad)。

1.3 探针序列

1.3.1 数字微滴 PCR 实验所用探针序列 由江苏泓讯生物科技股份有限公司合成。IS711 正反向引物及探针序列: IS711-F ATGTTTTCTCGCATCGCAGC; IS711-R AGGAACGCCATCAGATTGAA; IS711-Probe FAM-CGACGATAGCGTTTCAA-NFQ-MGB。RB51 正反向引物及探针序列: RB51-F CCGGGCGTACCAACTCG; RB51-R CGAAGCCTTACAGATGAGCAA; RB51-Probe FAM-AAGATATGCTTCGATCCGGT-NFQ-MGB。

1.3.2 荧光定量 PCR 实验所用探针序列 由江苏泓讯生物科技股份有限公司合成。IS711 正反向引物及探针序列: IS711-qF GACTGGAGGCTGTACAAGGA; IS711-qR ATGGACGAAACCCACGAATG; IS711-qProbe FAM-TCGCATCGCAGCGCAATGCG-

BHQ; RB51 正反向引物及探针序列: RB51-qF TGGCGTCGACAAATAATCGG; RB51-qR TGGAACCGGATCGAAGCATA; RB51-qProbe FAM-CTGCGGCCGGGCGTACCAAC-BHQ。

1.4 方法

1.4.1 DNA 提取 取 1.0 ml 菌悬液于 1.5 ml 的离心管中, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清。按照 DNA 提取试剂盒说明书进行 DNA 提取操作, 将提取的 DNA 放置 -20 °C 保存备用, 并将 DNA 溶液用 Gene Quant 定量仪测浓度和纯度。

1.4.2 数字微滴 PCR 检测

1.4.2.1 用阳性对照 M3 (中国 CDC 提供羊布鲁菌 DNA) 做浓度梯度检测所设计探针的有效性 及灵敏度 对阳性对照样本 M3 进行梯度稀释, 按照 10 倍梯度稀释法得到以下梯度样本: 1 ng/ μ l, 1×10^{-1} ng/ μ l, 1×10^{-2} ng/ μ l, 1×10^{-3} ng/ μ l, 1×10^{-4} ng/ μ l, 1×10^{-5} ng/ μ l。配置体系, 体系中模板投入量为 1 μ l, 10 μ M 正向引物和反向引物各 1.8 μ l 使整个体系中引物终浓度为 900 nM, 1 μ M 探针加入 5 μ l 使终浓度为 250 nM, 加入 ddPCR Supermix 10 μ l, 补水至体系总反应体系 20 μ l。

体系配好以后指弹法混匀, 桌面离心机快速离心使液体收集到管底。将 20 μ l 反应体系和 70 μ l 微滴生成油小心分别转入加样孔和加油孔中, 盖上胶垫, 转入微滴生成仪。反应结束后, 将微滴生成的产物约 40 μ l 体系转入 96 孔板中。将 96 孔板盖上专用的可穿透膜, 用预热到 180 °C 的 PX1 封膜仪对其进行封膜 (180 °C, 10 s)。封膜后将 96 孔板放入 T100 中进行 PCR 反应。反应条件为 95 °C 10 min; 94 °C 30 s, 55 °C 60 s, 40 个循环; 98 °C 10 min。

将反应结束后的 96 孔板放入 QX200 中的 96 孔板固定装置组装好。打开电脑中的 QuantaSoft 软件, 在读取实验结果前先做一遍 Flush System。之后在软件中对 96 孔板样本信息进行程序设置, 实验类型选择绝对定量。

检查程序设置信息无误后即可运行程序, 结束后检查实验数据。观察微滴生成数是否符合泊松分布, 人工核实调整出现阈值判读失误的数据, 保存实验结果并进行后续的解读分析。

1.4.2.2 用 M3 测试有效的探针检测 20 例临床患者 DNA 标本 实验中使用布鲁菌 DNA (M3: 1×10^{-4} ng/ μ l) 作为阳性对照, 用 2 例健康人血清提取 DNA 作为阴性对照。测试样本为 20 例急性期布鲁菌病患者的血清 DNA。整个体系中引物终浓度为 900 nM, 探针终浓度为 250 nM。阳性对照模板加入量 1×10^{-4} ng, 待测样本和阴性对照由于

都是人血清 DNA, 投入 20 ng 作为模板配制 20 μ l PCR 反应体系。

体系配好以后指弹法混匀, 桌面离心机快速离心使液体收集到管底。如前文所述将样本转移至微滴生成卡槽中在微滴生成仪上进行微滴生成后将反应产物 40 μ l 转移至 96 孔板中封膜后进行 PCR 反应。将反应结束后的 96 孔板放入 QX200 中的 96 孔板固定装置中组装好。打开电脑上的 QuantaSoft 软件, 在读取实验结果前先做一遍 Flush Syster。之后在软件中对 96 孔板样本信息进行程序设置, 实验类型选择绝对定量。

检查程序设置信息无误后即可运行程序, 结束后检查实验数据, 人工核实调整出现阈值判读失误的数据, 保存实验结果并进行后续的解读分析。

1.4.3 荧光定量 PCR 检测

1.4.3.1 标准品制备和标准曲线测定 以羊标准菌株 M3 DNA 为模板, 分别用前文所述引物 (IS711-qF/IS711-qR, RB51-qF/RB51-qR) 扩增目的片段为 120 bp 和 85 bp, 使用 QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, 28704) 对目的条带进行切胶回收。使用克隆试剂盒 (C601-01, vazyme) 将目的条带克隆至载体 (pCE2 TA/Blunt-zero 质粒) 后热击法转化至 DH5 α 感受态中, 在含有氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基上 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取单克隆进行 Sanger 法测序确认插入序列正确后扩大培养,

使用 QIAprep mini kit (27104, QIAGEN) 进行质粒提取并用 Qubit 检测质粒浓度。将所制备的质粒浓度换算成拷贝数, 其中每微开样品中检测基因拷贝数按以下公式估算: 样品拷贝数 = 浓度 (ng/ μ l) \times 阿伏伽德罗常数 $\times 10^{-9}$ / (660 \times 重组质粒碱基数), 阿伏伽德罗常数 = 6.02×10^{23} mol $^{-1}$ 。将质粒按基因拷贝数 10 倍梯度稀释为 $2 \times 10^1 \sim 2 \times 10^6$ copies/ μ l。

1.4.3.2 荧光定量 PCR 检测 20 例临床患者 DNA 标本 用 Taqman qPCR 试剂配制 20 μ l 体系, 体系中使用引物和探针的终浓度均为 200 nM, 标准品投入量按质粒拷贝数梯度各加入 1 μ l。M3 作为阳性对照, 2 例健康人血清 DNA 作为阴性对照, 20 例临床患者血清 DNA 样本作为研究对象, 各投入 2 μ l 作为模板。反应程序为 50 $^{\circ}$ C 2min, 95 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s /60 $^{\circ}$ C 30 s 40 个循环。运行结束后分析实验数据。

2 结 果

2.1 数字 PCR 检测结果 具体见表 1 和表 2。3、6 和 11 号标本为血培养阳性标本, 数字 PCR 检测为阳性结果, IS711 引物检测结果 3 者分别为 23.15、15.57、10.17 copies/ μ l, RB51 引物检测结果分别为 22.80、12.17 和 10.03 copies/ μ l。其余 17 个血培养阴性但临床诊断急性期布鲁菌病患者血清 DNA 检测为阳性, 检测拷贝数较低, IS711 引物检测拷贝数集中于 0.10 \sim 38.57 copies/ μ l, RB51 引物检测拷贝数集中于 0.08 \sim 40.97 copies/ μ l。

表 1 数字 PCR IS711 检测结果
Table 1 Digital PCR IS711 test results

序号	样本	浓度 (copies/ μ l)	每 20 μ l 有效微滴反应体系中阳性拷贝数	有效微滴数
阴性对照	健康人全血 DNA_neg. IS711	0	0	16 186.00
阳性对照	M3_Pos.IS711	17.40	348.00	14 867.00
样品	1	2.40	48.00	16 208.50
	2	0.10	2.00	15 875.33
	3	23.15	463.00	14 100.50
	4	45.75	915.00	12 528.50
	5	8.45	169.00	10 115.00
	6	15.57	311.33	15 703.67
	7	11.43	228.67	16 491.67
	8	12.50	250.00	16 508.00
	9	19.90	398.00	17 040.67
	10	15.50	310.00	17 468.50
	11	10.17	203.33	16 672.33
	12	20.75	415.00	16 358.50
	13	23.59	471.80	16 767.67
	14	24.13	482.67	16 513.00
	15	19.40	388.00	15 684.00
	16	31.30	626.00	16 192.33
	17	29.60	592.00	16 623.00
	18	10.53	210.67	17 753.67
	19	17.50	350.00	16 336.50
	20	38.57	771.33	17 929.33

表2 数字PCR RB51 检测结果
Table 2 Digital PCR RB51 test results

序号	样本	浓度 (copies/μl)	每 20 μl 有效微滴反应体系中阳性拷贝数	有效微滴数
阴性对照	健康人全血 DNA_neg. RB51	0	0	16 968.00
阳性对照	M3_Pos.RB51	19.10	382.00	17 359.00
样品	1	2.37	47.33	16 588.00
	2	0.08	1.67	18 374.00
	3	22.80	456.00	16 924.00
	4	39.70	794.00	12 578.33
	5	11.50	230.00	17 943.67
	6	12.17	243.33	18 227.00
	7	12.60	252.00	18 662.33
	8	14.20	284.00	17 554.33
	9	19.47	389.33	18 409.67
	10	14.87	297.33	17 942.00
	11	10.03	200.67	17 937.00
	12	19.77	395.33	18 104.00
	13	18.03	360.67	18 401.00
	14	23.53	470.67	17 752.67
	15	17.87	357.33	18 355.67
	16	32.27	645.33	18 406.33
	17	28.30	566.00	16 329.33
	18	9.60	192.00	17 959.33
	19	16.90	338.00	17 563.67
	20	40.97	819.33	17 521.67

2.2 荧光定量 PCR 检测结果 荧光定量 PCR 检测结果显示, M3 阳性样本 3 个重复平均 CT 值为 14.28, 而 20 例急性期布鲁菌病患者血清 DNA 和 2 例健康人全血 DNA CT 值均 ≥ 36 , 与无模板对照 (CT=37) 持平, 基本不具有参考讨论意义, 判定为无阳性检出。

2.3 患者临床信息 共入组 20 例患者, 其中男 16 例, 女 4 例, 血培养阳性 3 例, 血培养阴性但符合急性期布鲁菌病血清学诊断标准患者 17 例。20 例患者发病到诊断时间为 4 ~ 120 d, 平均为 36.9 d。患者均有羊、牛接触史, 有 9 例伴有脊柱炎或骶髂关节炎或椎旁脓肿。入组前有 13 例抗生素治疗史 (8 ~ 26 d), 19 例患者有不同程度的发热。

3 讨 论

目前, 我国用于布鲁菌病诊断主要有 3 种方法: 一是血清学检测方法, 有虎红平板凝集试验 (rose-bengal plate agglutination test, RBPT)、SAT、ELISA、补体结合试验和 Coombs 试验, 但诊断灵敏度和特异度存在争议 [2-5]。二是细菌分离培养, 是诊断的金标准, 但存在培养时间长, 阳性率低, 且存在生物安全性风险 [6]。三是分子生物学诊断技术, PCR 具有高效、省时、安全等特点, 已被用于布鲁菌检测 [7]。

目前, 国内和国外对血清学诊断技术诊断效能存在争议。Peeridogaheh 等 [8] 领导的研究团队系统评价了各项实验室诊断技术对于急性期布鲁菌

病诊断的参考价值: RBPT 试验灵敏度为 48.1%, ELISA 法检测 IgG、IgM 灵敏度分别为 65.6% 和 49.6%, IgG+IgM 灵敏度为 34.35%, Coombs 试验灵敏度为 72.5%。RBPT 试验特异度为 96.1%, 其余各项试验技术特异度接近 100%。其他两项研究也证实参考目前布鲁菌病诊断标准, 存在误诊、漏诊情况 [9-10]。我国主要采用 RBPT 和 SAT 技术进行布鲁菌病诊断。文献报道 RBPT 和 SAT 在急性期布鲁菌病中诊断与临床符合率较高, 与国外文献报道差异较大 [11-12]。分析原因可能为: ①我国指南现行诊断标准推荐 RBPT 作为初筛试验, SAT 作为确证试验, WHO 则推荐 RBPT、SAT 作为初筛试验, Coombs 和 ELISA 作为确证试验。RBPT 和 SAT 同为抗体凝集试验, 同时作为初筛和确证试验, 诊断效能上存在一定交叉。②我国指南规定 SAT 诊断滴度 $\geq 1:100$, WHO 指南则推荐 SAT 诊断滴度 $\geq 1:160$, 2 者差异明显, 直接导致 SAT 诊断的灵敏度差异。

荧光定量 PCR 能够快速检测布鲁菌, 能在种水平上鉴定牛、羊、猪和犬种, 且无须进行电泳分析, 可避免污染, 已被用于布鲁菌诊断, IS711 和 RB51 为最优效的靶基因序列 [13]。但是, 荧光定量 PCR 为相对定量技术, 其精确性和稳定性, 受到 PCR 抑制物、标准品质量和标准曲线偏斜的影响, 导致各实验室之间的可比性差, 作为临床常规检测技术存在不足 [14]。而且, 荧光定量 PCR 在我国用于布鲁菌病临床检测技术可能存在问题, 我国

布鲁菌病患者诊断周期长,患者多自行服用抗生素治疗,常用的头孢类和喹诺酮类抗生素治疗布鲁菌病有效,导致布鲁菌血清含量低,存在时间短。针对我国国情而言,需要更为敏感和稳定的PCR检测技术。

数字PCR对样品中的核酸进行定量分析,不依赖标准品,也不需要标准曲线,可直接对核酸靶标进行绝对定量。具有比荧光定量PCR更高的重现性和更小的变异性。在国外已被应用于HIV和HBV病毒载量测定^[15]。同时,数字PCR技术检测下限为0.001%,灵敏度较荧光定量PCR高1000倍,有作为布鲁菌病标准实验室检测方法的潜力。

本研究结果显示,符合急性期布鲁菌病诊断标准的20例血清标本,数字PCR检测结果均为阳性,荧光定量PCR检测均为阴性,出现极端的结果。为避免实验技术造成误差(常见的如引物问题),本试验分别选取IS711和RB51为靶基因序列进行检测,结果显示,2者均为数字PCR检测全阳性,荧光定量PCR检测全阴性。同时,数字PCR检测结果显示,分别以IS711和RB51为靶基因序列进行检测,血清布鲁菌含量较为一致。上述结果证实,实验操作过程不存在问题。

本研究结果显示,数字PCR检测均为阳性,拷贝数集中在0.08~40.97 copies/ μ l,总体标本拷贝数水平低,而荧光定量PCR检测均为阴性。分析原因可能为:①荧光定量PCR通过在反应体系中加入荧光试剂或者荧光标记的探针来实时检测荧光信号,借助荧光曲线的CT值来定量起始靶基因的浓度。在低拷贝靶分子、模板背景复杂等情况下,其检测的灵敏度、精确度都受到了限制。②数字PCR可以将一个完整的PCR体系通过微滴生成反应分散为成千上万个独立的反应,每个反应中都包含1个或者0个模板。这些反应互不干扰,反应结束后,通过检测独立微滴的反应产物进行计数来确定阳性拷贝数。这种检测方式不依赖于标准曲线,也可以排除样本背景干扰。③实验中使用的阳性对照为纯培养的布鲁菌提取DNA,样本单一,所以在数字PCR和荧光定量PCR中都可以检出。但临床患者血清提取DNA为患者核酸和低拷贝的布鲁菌核酸混合物,在荧光定量PCR中由于反应在同一个体系中进行,大量的人基因组会干扰引物和探针的特异度反应,而数字PCR不存在这样的问题。

本研究根据布鲁菌保守基因设计引物,合成探针,建立了用于布鲁菌的数字PCR检测技术,

初步证实数字PCR技术可以作为急性期布鲁菌病实验室诊断技术的有效补充。但本研究具有局限性,主要集中在以下两方面,一是急性期布鲁菌病患者标本少,影响实验结果的可信度;二是2种实验室检测技术比较需要在多个实验室进行验证,证实2者之间的优劣,避免实验误差带来的影响。后期研究中将扩大样本量,纳入阴性对照病例,设立完整诊断试验方案,进而研究2种PCR技术的灵敏度和特异度。

【参考文献】

- [1] 中华人民共和国卫生部. 布鲁氏菌病诊疗指南(试行) [J]. 传染病信息, 2012, 25(6):323-324.
- [2] Young EJ. Brucellosis: current epidemiology, diagnosis, and management [J]. *Curr Clin Top Infect Dis*, 1995, 15:115-128.
- [3] Mampur BG, Biradar MS, Bidri RC, et al. Protean clinical manifestations and diagnostic challenges of human brucellosis in adults: 16 years' experience in an endemic area [J]. *J Med Microbiol*, 2006, 55(Pt 7):897-903.
- [4] Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, et al. Laboratory-based diagnosis of brucellosis—a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis [J]. *Clin Lab*, 2003, 49(11-12):577-589.
- [5] Bosilkovski M, Katerina S, Zaklina S, et al. The role of Brucellacapt test for follow-up patients with brucellosis [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2010, 33(5):435-442.
- [6] Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, et al. Brucellosis [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(22):2325-2336.
- [7] Morata P, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, et al. Development and evaluation of a PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(1):144-148.
- [8] Peeridogaheh H, Golmohammadi MG, Pourfarzi F. Evaluation of ELISA and Brucellacapt tests for diagnosis of human brucellosis [J]. *Iran J Microbiol*, 2013, 5(1):14-18.
- [9] Kunda J, Fitzpatrick J. Health seeking behaviour of human brucellosis cases in rural Tanzania [J]. *BMC Publ Health*, 2007, 7:315.
- [10] 王锐泽, 皮鑫, 甄清, 等. 冻存人血中分离的5株布鲁杆菌的生物学特征分析 [J]. *中国地方病学杂志*, 2015, 34(11):805-807.
- [11] 刘景瑶, 毕惠梅, 赵冬梅, 等. 布病血清学检测在布鲁杆菌病诊断中的价值 [J]. *国际免疫学杂志*, 2018, 41(3):284-286.
- [12] 刘熹, 姜海, 崔步云, 等. 对2004-2014年人间布鲁杆菌病实验室检测方法的系统评价 [J]. *中国地方病学杂志*, 2015, 34(12):920-925.
- [13] Hänsel C, Mertens K, Elschner MC, et al. Novel real-time PCR detection assay for *Brucella suis* [J]. *Vet Rec Open*, 2015, 2(1):e000084.
- [14] Bounaadja L, Albert D, Chenais B, et al. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp: a comparative study of IS711, bcp31 and pertarget genes [J]. *Vet Microbiol*, 2009, 137(1-2):156-164.
- [15] Whale AS, Devonshire AS, Karlin-Neumann G, et al. International interlaboratory digital PCR study demonstrating high reproducibility for measurement of a rare sequence variant [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(3):1724-1733.

(2019-06-21 收稿 2019-08-08 修回)

(本文编辑 张云辉)