

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.04.010
文章编号: 1005-8982 (2018) 04-0045-06

海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌二重 PCR 检测方法的建立及应用*

武迪, 陈世玖, 王成, 龙航, 杨军, 刘珑玲

[遵义医学院第五附属(珠海)医院 整形手外科, 广东 珠海 519100]

摘要: 目的 建立一种能同步检测鉴定海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌的二重 PCR 方法, 为手部及皮肤软组织感染海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌早期诊断、早期治疗服务。**方法** 通过 GeneBank 数据库和文献查找海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌的特有基因序列, 设计 2 对能扩增海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌特有序列的引物, 建立能同步检测鉴定海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌的二重 PCR, 特异性及敏感性。并初步应用该二重 PCR 检测鉴定 19 份临床考虑上肢感染 NTM 的标本。**结果** 本研究成功地建立能同步检测鉴定海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌的二重 PCR, 扩增产物的长度海分枝杆菌为 429 bp, 溃疡分枝杆菌为 240 bp, 检测其他非结核分枝杆菌时未出现阳性条带, 敏感性试验最低可检测出 0.508 pg/ μ l 海分枝杆菌, 44.8 fg/ μ l 溃疡分枝杆菌。检测鉴定 19 份临床标本, 42.1% (8 份) 为海分枝杆菌感染, 15.8% (3 份) 为溃疡分枝杆菌感染, 42.1% (8 份) 未检出病原菌。**结论** 本研究建立的二重 PCR 可早期、快速地诊断手部及皮肤软组织感染海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌, 为临床制定最佳治疗方案提供一定依据。

关键词: 二重 PCR; 海分枝杆菌; 溃疡分枝杆菌; 同步检测; 手; 皮肤软组织

中图分类号: R378

文献标识码: A

Establishment and application of a duplex PCR method for detection of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans**

Di Wu, Shi-jiu Chen, Cheng Wang, Hang Long, Jun Yang, Long-ling Liu

[Department of Plastic and Hand Surgery, the Fifth Affiliated (Zhuhai) Hospital of Zunyi Medical College, Zhuhai, Guangdong 519100, China]

Abstract: Objective To establish a duplex PCR method that can synchronously detect and identify *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans* in order to detect and treat soft tissue infections of the arms and skin from these mycobacteria at an early stage. **Methods** The specific gene sequences for *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans* were searched from the GeneBank and the available literature, and NCBI/Primer-BLAST software and MFPrimer-2.0 software were utilized to design two pairs of primers that could amplify the specific gene sequences of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans*. A duplex PCR was to be established to synchronously detect and identify *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans*, and its optimal annealing temperature, specificity and sensitivity were explored. Then this duplex PCR was preliminarily applied to identify 19 specimens of clinically-considered non-tuberculosis mycobacteria infections (NTM) of the upper limbs. **Results** This study successfully established a duplex PCR that can synchronously detect and identify *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans*. The length of amplified product of *Mycobacterium marinum*

收稿日期: 2017-05-09

* 基金项目: 贵州省科学技术基金 No.: [黔科合 J 字 LKZ (2012) 10]

[通信作者] 陈世玖, E-mail: csj6916@163.com

was 429 bp and that of *Mycobacterium ulcerans* was 240 bp at an optimal annealing temperature of 62.7°C. Positive bands did not appear when other NTM were detected. The lowest detectable level was 0.508 pg/μl for *Mycobacterium marinum*, and 44.8 fg/μl for *Mycobacterium ulcerans*. In the 19 clinical specimens, *Mycobacterium marinum* infection was detected and identified in 8 (42.1%), *Mycobacterium ulcerans* in 3 (15.8%) and pathogenic bacteria were not detected in 8 (42.1%). **Conclusions** The duplex PCR established in this study can quickly diagnose *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans* infections of the soft tissue of the arms and skin at an early stage, providing a basis for clinical formulation of the optimal treatment plan.

Keywords: duplex PCR; *Mycobacterium marinum*; *Mycobacterium ulcerans*; synchronous detection; hand; soft tissue of skin

海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌是常见的引起手部及皮肤软组织感染的非结核分枝杆菌 (nontuberculous mycobacteria, NTM) [1-3]。根据伯杰系统细菌学手册及 Runyon 分类法, 海分枝杆菌属 I 组缓慢生长型光产色素菌, 溃疡分枝杆菌属 III 组缓慢生长型不产色素菌 [4]。海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌普遍存在水环境中及动物体上, 主要通过伤口侵入人体引起病变 [5-7], 所致疾病其治疗有所不同 [7-8], 故准确诊断鉴定海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌感染很有意义。然而海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌感染临床表现基本相似, 通过临床表现不能诊断及鉴别海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌感染, 传统的检测方法耗时且难于鉴别。因此, 本研究建立二重 PCR 方法同步检测鉴定海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌, 为早期诊断、早期治疗手部及皮肤软组织感染海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌提供一定依据, 并初步应用该方法检测鉴定 2014 年 1 月-2015 年 12 月遵义医学院第五附属 (珠海) 医院收集的 19 份临床上考虑上肢感染 NTM 的标本。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 标准菌 海分枝杆菌 (ATCC927) 购自美国 ATCC 公司, 鸟分枝杆菌 (ATCC25291)、胞内分枝杆菌 (ATCC13950)、堪萨斯分枝杆菌 (ATCC12478)、偶然分枝杆菌 (ATCC6841)、龟分枝杆菌 (ATCC35752)、溃疡分枝杆菌 (ATCC19423) 均购自美国 MicroBioLogics 公司。

1.1.2 纳入标准 临床考虑上肢感染 NTM 的患者: ①患者均来自沿海地区, 与海洋生物有密切接触史; ②临床表现: 上肢出现丘疹、皮下肉芽肿伴或不伴有溃疡、滑膜炎、腱鞘炎、关节炎、骨破坏; ③病理检查示慢性肉芽肿性炎症, 可有干酪样坏死或抗酸染色找到抗酸杆菌; ④患者无低热、盗汗、乏力等结核临

床表现, 相关辅助检查提示无肺结核; ⑤常规抗感染治疗无效。

1.1.3 一般资料 本研究共纳入患者 19 例, 其中, 男性 8 例, 女性 11 例; 年龄 29 ~ 62 岁。渔民 11 例, 海产品养殖者 3 例, 海产品销售员 4 例, 其他 1 例。均有海洋生物刺伤史, 病程 4 周 ~ 2 年。手术切除病灶组织分为 2 份, 一份送病理检查, 另一份保存于 -20°C 作为本研究的待测标本, 病检结果示病灶组织病理改变均符合 NTM 感染。所有患者经抗 NTM 治疗有效。

1.1.4 仪器和试剂 T100™ Thermal Cycler (BioRad PCR 仪) 购自深圳市宇德立生物科技有限公司, Gel Doc XR+ 凝胶成像分析系统购自北京赛百奥科技有限公司, THERMO Multiskan GO 全波长酶标仪购自北京平利洋公司, Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购自生工生物工程 (上海) 有限公司, EmeraldAmp PCR Master Mix 购自大连宝生物工程有限公司, DL600 DNA Marker 购自上海生工生物工程 (上海) 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计 通过参考文献 [9-10] 及 GeneBank 查找海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌的特有基因序列, 采用 NCBI/Primer-BLAST 软件 [11] 及 MFEprimer-2.0 软件 [12] 设计 2 对特异性引物。引物由上海生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 引物序列见表 1。

1.2.2 临床标本及标准菌株 DNA 提取 采用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取临床标本及标准菌 DNA。取菌液或组织匀浆液 1 ml 于 1.5 ml EP 管中, 室温离心, 8 000 r/min, 离心 1 min, 弃上清, 收集菌体, 加入 180 μl 溶菌酶 (20 mg/ml) 混匀, 37°C 电热恒温水浴箱水浴 40 min, 加入 20 μl Proteinase K 溶液混匀, 56°C 电热恒温水浴箱水浴 30 min, 加入 200 μl Buffer BD, 充分颠倒混匀, 加入 200 μl 无水乙醇, 充分颠倒混匀, 将吸附柱放入收集管中, 将溶液

表 1 二重 PCR 引物序列

名称	目标片段	GenBank 号	引物序列	Tm/℃	长度 /bp
海分枝杆菌	mel2	AY623664.1	正向: 5'-GTATCAGGACTACTTCTCGCT-3'	59.0	429
			反向: 5'-CTGGTCCCGACATCGTATTG-3'	60.0	
溃疡分枝杆菌	IS2404	AF003002.1	正向: 5'-TATTGCCTGTGTCGTGGTT-3'	59.5	240
			反向: 5'-GCCAACACATCATCGGAAGC-3'	60.0	

和半透明纤维悬浮物全部加入吸附柱中,静置 2 min,室温离心后,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入收集管中,加入 500 ml PW Solution,室温离心,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入收集管中,加入 500 ml Wash Solution,室温离心后,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入收集管中,室温离心后,打开吸附柱盖子,室温彻底晾干 Wash Solution,取出吸附柱放入 1 个新的 1.5 ml EP 管中,加入 CE Buffer 50 ~ 100 ml,室温离心后收集 DNA 溶液,-20℃保存备用。

1.2.3 PCR 扩增目的片段 PCR 反应体系的组成:引物 1.0 ml(终浓度为 0.4 mmol/L),模板 DNA 1.0 ml, Emerald Amp PCR Master Mix 10.0 ml,加入 ddH₂O 至总体积为 25 ml。PCR 反应条件:95℃预变性 480 s,95℃变性 30 s,67.0 ~ 60.0 退火 20 s,72℃延伸 60 s,共 30 个循环,72℃继续延伸 60 s。反应结束后于 4℃保存。本研究设计的 2 对引物其 T_m 值在 59.0 ~ 60.0℃,平均 T_m 值为 60.0℃。故预设退火温度在 67.0 ~ 60.0℃,观察退火温度对 PCR 结果的影响,确定最佳退火温度,并以最佳退火温度进行下一步实验。PCR 扩增产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳后于 Gel Doc XR+ 凝胶成像分析系统进行分析,判读结果。

1.2.4 标准菌单一 PCR 扩增测序 用通用引物(正向引物:5'-ATAAGCCTGGGAAACTGGGT-3',反向引物:5'-CACGCTCACAGTTAAGCCGT-3')分别对本实验所用到的海、鸟、胞内、堪萨斯、偶然、龟、溃疡分枝杆菌的标准菌 DNA 进行 PCR 扩增,电泳观察是否出现相应的目标条带,并对标准菌 PCR 扩增后的产物进行 DNA 测序,测序结果与 GeneBank 数据库相应标准菌基因序列进行比对分析,评估本研究所用的标准菌是否符合标准菌的要求。

1.2.5 验证引物特异性 用海分枝杆菌引物分别与海、鸟、胞内、堪萨斯、偶然、龟、溃疡分枝杆菌(标准菌)DNA 模板进行 PCR 扩增,电泳观察是否只有海分枝杆菌 DNA 模板反应管出现 429 bp 的目标条带,验证海分枝杆菌引物的特异性,用同样的方法可验证

溃疡分枝杆菌引物的特异性。

1.2.6 二重 PCR 的建立 海分枝杆菌引物与海分枝杆菌模板 DNA 进行 PCR 扩增,溃疡分枝杆菌引物与溃疡分枝杆菌模板 DNA 进行 PCR 扩增,建立单一 PCR;海分枝杆菌、溃疡分枝杆菌引物与海分枝杆菌、溃疡分枝杆菌模板 DNA 于同一反应管内进行 PCR 扩增,建立二重 PCR。

1.2.7 二重 PCR 的检测 ①特异性:二重 PCR 分别检测海、鸟、胞内、堪萨斯、偶然、龟、溃疡分枝杆菌及海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌的混合样品,电泳观察是否出现目的条带。②准确性:二重 PCR 分别检测海及溃疡分枝杆菌,电泳观察是否出现相应的特异性条带。③敏感性:二重 PCR 敏感性是指二重 PCR 能检测到的最低细菌 DNA 浓度。先用 THERMO Multiskan GO 全波长酶标仪检测已提取的海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌标准细菌 DNA 原液中 DNA 的浓度,将海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌标准细菌 DNA 原液用超净水以 10 倍系列(1×10⁻¹、1×10⁻²、1×10⁻³、1×10⁻⁴、1×10⁻⁵、1×10⁻⁶、1×10⁻⁷、1×10⁻⁸和 1×10⁻⁹)稀释后,分别取 1ml 进行 PCR 电泳后观察各目标条带的清晰程度,初步确定该多重 PCR 的敏感性。

1.2.8 二重 PCR 检测临床标本 二重 PCR 检测 19 份临床标本,以 DL600 DNA Marker 作对照,根据临床标本产生的目标条带与 DL600 DNA Marker 对应关系,鉴定临床标本病原菌,并对结果进行分析。

2 结果

2.1 标准菌单一 PCR 扩增测序结果

用通用引物扩增 7 种分枝杆菌 DNA,分别获得的目标条带。单一 PCR 扩增标准菌 DNA 测序结果与 GeneBank 中相应菌种 DNA 进行比对。单一 PCR 扩增标准菌 DNA 序列与 GenBank 数据库中相应菌种 DNA 序列同源性 >99%,说明本研究所用的标准菌符合标准菌的要求。海分枝杆菌标准菌通用引物 PCR 扩增

双向测序图及拼接后序列用 BLAST 与 GenBank 数据库中的 AF057476.1 比对, 其一致性为 100%。鸟分枝杆菌标准菌通用引物 PCR 扩增双向测序图及拼接后序列用 BLAST 与 GenBank 数据库中的 AF057457.1 进行比对, 其一致性为 99%。堪萨斯分枝杆菌标准菌通用引物 PCR 扩增双向测序图及拼接后序列用 BLAST 与 GenBank 数据库中的 AF057473.2 进行比对, 其一致性为 100%。偶发分枝杆菌标准菌通用引物 PCR 扩增双向测序图及拼接后序列用 BLAST 与 GenBank 数据库中的 AF057464.1 进行比对, 其一致性为 100%。龟分枝杆菌标准菌通用引物 PCR 扩增双向测序图及拼接后序列用 BLAST 与 GenBank 数据库中的 AF057460.1 进行比对, 其一致性为 99%。胞内分枝杆菌标准菌通用引物 PCR 扩增双向测序图及拼接后序列见图 7。溃疡分枝杆菌标准菌通用引物 PCR 扩增双向测序图及拼接后序列用 BLAST 与 GenBank 数据库中的 AF057491.1 进行比对, 其一致性为 100%。经扩增后测序并对比, 该研究所用海、鸟、堪萨斯、偶发、龟、胞内、溃疡分枝杆菌的标准菌均符合研究要求。

2.2 引物特异性检测结果

海分枝杆菌的引物与海分枝杆菌模板 DNA 结合出现 429 bp 的目标条带, 与其他分枝杆菌模板 DNA 无条带出现 (见图 1 和表 2)。溃疡分枝杆菌的引物与溃疡分枝杆菌模板 DNA 结合出现 240 bp 的目标条带, 与其他分枝杆菌模板 DNA 无条带 (见图 2 和表 2)。表明海、溃疡分枝杆菌引物是特异的。

2.3 二重 PCR 的成功建立

海分枝杆菌引物与海分枝杆菌模板 DNA 进行 PCR 扩增出现 429 bp 的目标条带, 溃疡分枝杆菌引物与溃疡分枝杆菌模板 DNA 进行 PCR 扩增出现 240 bp 的目标条带, 单一 PCR 成功建立 (见图 3)。海分枝杆菌、溃疡分枝杆菌引物与海分枝杆菌、溃疡分枝杆菌模板 DNA 于同一反应管内进行 PCR 扩增出现 429 和 240 bp 的目标条带 (见图 3)。表明二重 PCR 成功建立。

2.4 探索二重 PCR 的最佳退火温度

二重 PCR 其他反应条件不变, 退火温度从 67.0 ~ 60.0℃, 各目标条带在 62.7℃ 都出现且较清晰 (见图 4)。所以二重 PCR 的最佳退火温度为 62.7℃。

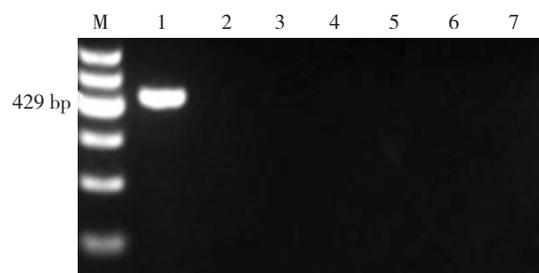
2.5 二重 PCR 敏感性

海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌标准细菌 DNA 原液中所含 DNA 的量: 海分枝杆菌 1.27 ng/μl、溃疡分枝

杆菌 11.2 ng/μl, 将各标准细菌 DNA 原液用无菌超净水以 10 倍系列 (1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 和 1×10^{-9}) 稀释后, 分别取 1 μl 进行 PCR 电泳确定其敏感性 (见图 5)。该多重 PCR 最低可检测出 0.508 pg/μl 海分枝杆菌 DNA, 44.8 fg/μl 溃疡分枝杆菌 DNA。

2.6 二重 PCR 检测临床标本

二重 PCR 检测 19 份临床标本, 11 份出现目标条带, 检出率为 58%, 海分枝杆菌占 42.1% (8 例), 溃疡分枝杆菌占 15.8% (3 例), 其中以海分枝杆菌感染最多见 (见图 6、7)。二重 PCR 从获取临床标本到检测鉴定海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌经测算需 6 ~ 7 h。



M: Marker; 1: 海分枝杆菌; 2: 鸟分枝杆菌; 3: 胞内分枝杆菌; 4: 堪萨斯分枝杆菌; 5: 偶然分枝杆菌; 6: 龟分枝杆菌; 7: 溃疡分枝杆菌

图 1 海分枝杆菌引物特异性

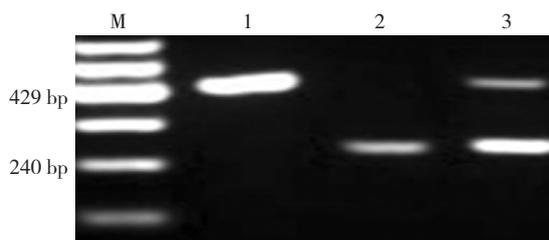


M: Marker; 1: 海分枝杆菌; 2: 鸟分枝杆菌; 3: 胞内分枝杆菌; 4: 堪萨斯分枝杆菌; 5: 偶然分枝杆菌; 6: 龟分枝杆菌; 7: 溃疡分枝杆菌

图 2 溃疡分枝杆菌引物特异性

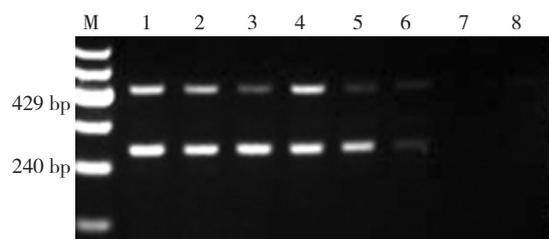
表 2 标准菌 DNA 模板与引物进行 PCR 产生目标条带的情况

标准菌	海分枝杆菌引物	溃疡分枝杆菌引物
海分枝杆菌	+	-
鸟分枝杆菌	-	-
胞内分枝杆菌	-	-
堪萨斯分枝杆菌	-	-
偶然分枝杆菌	-	-
龟分枝杆菌	-	-
溃疡分枝杆菌	-	+



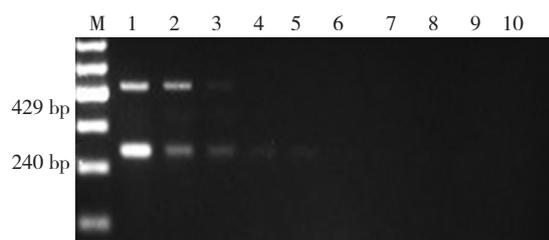
M: Marker, 1: 海分枝杆菌单一 PCR; 2: 溃疡分枝杆菌单一 PCR; 3: 海、溃疡分枝杆菌二重 PCR。

图3 二重 PCR 的建立



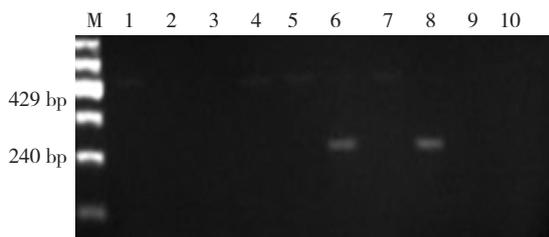
M: Marker, 1: 60.0°C; 2: 60.5°C; 3: 61.4°C; 4: 62.7°C; 5: 64.3°C; 6: 65.6°C; 7: 66.5°C; 8: 67.0°C

图4 二重 PCR 的退火温度



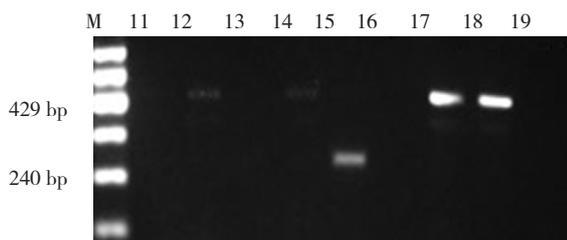
M: Marker, 1: 原液, 2: 1×10^{-1} ; 3: 1×10^{-2} ; 4: 1×10^{-3} ; 5: 1×10^{-4} ; 6: 1×10^{-5} ; 7: 1×10^{-6} ; 8: 1×10^{-7} ; 9: 1×10^{-8} ; 10: 1×10^{-9}

图5 二重 PCR 的敏感性



M: Marker; 1 ~ 10: 为 1 ~ 10 号临床标本

图6 二重 PCR 检测临床标本



M: Marker; 11 ~ 19: 为 11 ~ 19 号临床标本

图7 二重 PCR 检测临床标本

3 讨论

NTM 属分枝杆菌属,为一群细菌的总称,广泛存在于水、土壤和灰尘等自然环境中,大部分为腐物寄生菌,仅少部分对人体致病,既往被认为是条件致病菌。不同的 NTM 可引起不同的组织器官病变,海分枝杆菌主要引起皮肤软组织及手部感染^[13-14],溃疡分枝杆菌主要引起皮肤软组织^[14],这两种分枝杆菌引起的皮肤软组织感染其临床表现、病理检查相似,且作为检测鉴定分枝杆菌金标准的 16SrRNA 区域的基因也相同^[15]。因此,鉴别海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌存在困难。本研究以海分枝杆菌 mel2 基因序列及溃疡分枝杆菌 IS2404 基因序列作为靶序列建立二重 PCR 同步检测鉴定海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌,为临床早期诊断、早期治疗海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌感染提供一定依据显得很有价值。

二重 PCR 是指在同一反应管里加入两对引物同时扩增一个模板 DNA 的两个区域或两个模板 DNA 的聚合酶链反应。PCR 引物设计影响着 PCR 扩增的特异性及有效性,本研究采用 NCBI/Primer-BLAST 软件设计能扩增海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌靶序列的引物,并用 MFEprimer-2.0 软件评估引物自身及引物间的互补性,避免引物形成发夹结构或引物二聚体影响引物扩增的效率致二重 PCR 建立失败。

二重 PCR 的敏感性揭示二重 PCR 能检测的最低目标模板 DNA 的量,当检测的样品中所含的目标 DNA 量低于二重 PCR 能检测的最低目标 DNA 量时,二重 PCR 不会出现目标条带,得到假阴性结果。二重 PCR 的敏感性越高,能检测的目标 DNA 量越低,其假阴性结果越少。本研究建立的二重 PCR 最低可检测出最低可检测出 $0.508 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 的海分枝杆菌, $44.8 \text{ fg}/\mu\text{l}$ 的溃疡分枝杆菌,敏感性较高。

二重 PCR 检测 19 份考虑上肢感染 NTM 的临床标本,11 份临床标本出现阳性条带,检出率为 57.9%,8 份临床标本未检出病原菌,其原因:①收集标本时未取到病原菌所在区域;②标本中病原菌较少,所提取的 DNA 含量低于该二重 PCR 所能检测的最低 DNA 量,出现了假阴性结果;③收集的标本为其他 NTM 病原菌感染,本研究建立的二重 PCR 仅能检测鉴定海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌感染,故该二重 PCR 方法检测阴性的标本不排除其他 NTM 感染的可能。42.1%(8 份)临床标本被鉴定为海分枝杆菌感染,其可能的原因为本研究选取的临床标本均来自与海洋微生物有密

切接触史的患者,且为临床上考虑上肢感染 NTM 的标本。

参 考 文 献

- [1] ALCAIDE F, ESTEBAN J. Cutaneous and soft skin infections due to non-tuberculous mycobacteria[J]. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, 2010, 28(Suppl 1): 46-50.
- [2] BABAMAHOODI F, BABAMAHOODI A, NIKKHAHAN B. Review of mycobacterium marinum infection reported from iran and report of three new cases with sporotrichoid presentation[J]. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 2014, 16(2): e10120.
- [3] 王成, 陈世玖. 手部非结核分枝杆菌感染的临床治疗 [J]. *中华手外科杂志*, 2013, 29(1):54-55.
- [4] 中华医学会结核病学分会. 非结核分枝杆菌病诊断与治疗专家共识 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2012, 35(8): 527-580.
- [5] TEBRUEGGE M, CURTIS N. Mycobacterium marinum infection[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2011, 719: 201-210.
- [6] BOURICHA M, CASTAN B, DUCHENE-PARISI E, et al. Mycobacterium marinum infection following contact with reptiles: vivarium granuloma[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2014, 21: 17-18.
- [7] GARCHITORENA A, ROCHE B, KAMGANG R, et al. Mycobacterium ulcerans ecological dynamics and its association with freshwater ecosystems and aquatic communities: results from a 12-month environmental survey in cameroon[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014, 8(5): DOI: org/10.1371/journal.pntd.0002879.
- [8] WU T S, CHIU C H, YANG C H, et al. Fish tank granuloma caused by mycobacterium marinum[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41296.
- [9] EL-ETR S H, SUBBIAN S, CIRILLO S L, et al. Identification of two mycobacterium marinum loci that affect interactions with macrophages[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(12): 6902-6913.
- [10] NAKANAGA K, HOSHINO Y, YOTSU R R, et al. Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed in Japan from 1980 to 2010[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49(11): 3829-3836.
- [11] YE J, COULOURIS G, ZARETSKAYA I, et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction[J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13: 134.
- [12] QU W, ZHOU Y, ZHANG Y, et al. MFEprimer-2.0: a fast thermodynamics-based program for checking PCR primer specificity[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(Web Server issue): W205-208.
- [13] YOON H J, KWON J W, YOON Y C, et al. Nontuberculous mycobacterial tenosynovitis in the hand: two case reports with the MR imaging findings[J]. *Korean Journal of Radiology*, 2011, 12(6): 745-749.
- [14] ATKINS B L, GOTTLIEB T. Skin and soft tissue infections caused by nontuberculous mycobacteria[J]. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2014, 27(2): 137-145.
- [15] 孙王伟, 周燕菊, 谢怡萍, 等. PCR 直接测序法在脓肿分枝杆菌鉴定中的应用 [J]. *海南医学*, 2014, 25(22): 3342-3345.

(张西倩 编辑)