

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.10.02

多重 PCR 对禽分枝杆菌亚种鉴定的初步应用

张 阁¹, 彭 永¹, 刘国权¹, 蒋 卉¹, 冯 宇², 朱良全^{1*}, 丁家波^{1*}

(1. 中国兽医药品监察, 北京 100081; 2. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018)

[收稿日期] 2017-04-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 10-0011-07 [中图分类号] S852.6

[摘 要] 为建立禽分枝杆菌多重 PCR 鉴定方法, 根据国外报道的诊断方法设计 4 对特异性引物, 选用我国禽结核参考菌株 (CVCC 68201) 基因组 DNA 为模板, 优化了退火温度, 测定了 DNA 最小检测量, 并进行了特异性检验。采用优化好的多重 PCR 体系, 对国家兽医微生物菌种保藏中心保存的禽分枝杆菌标准菌株进行检测和分类。实验结果表明, 禽结核参考菌株 (CVCC 68201) 能很好的扩增出 577 bp (IS901 基因片段)、385 bp (IS1245 基因片段) 和 140 bp (dnaJ 基因片段) 三条目的条带, 基因组 DNA 的最小检测量为 0.38 ng/μL, 目的条带在退火温度 50 ℃ ~ 62 ℃ 之间均能得到有效扩增。对 23 株禽分枝杆菌菌株检测, 并设立牛分枝杆菌作为阴性对照, 最终将禽分枝杆菌菌株分为三大类: 禽亚种/森林土壤亚种、副结核亚种、人猪亚种, 与国家兽医微生物菌种保藏中心的分类结果相比不仅一致且更加详尽而有临床意义。因此, 基于分子生物学方法建立的多重 PCR 方法可以对禽分枝杆菌亚型进行快速鉴定并对禽结核病的诊断提供参考。

[关键词] 禽分枝杆菌; 亚型鉴定; 多重 PCR

Use of Multiplex PCR Assay for the Identification of *Mycobacterium avium* Sub-species

ZHANG Ge¹, PENG Yong¹, LIU Guo-quan¹, JIANG Hui¹, FENG Yu², ZHU Liang-quan^{1*}, DING Jia-bo^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine,

Shandong Agriculture University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Corresponding author: ZHU Liang-quan, E-mail: zhuliangquan9990@hotmail.com; DING Jia-bo, E-mail: dingjiabo@126.com

Abstract: In order to establish a multiplex PCR method for *Mycobacterium avium* (*M. avium*), four specific primers were designed according to the diagnostic methods reported in foreign countries. The genomic DNA of bovine tuberculosis reference strain (CVCC 68201) was selected as the template, the minimum detection amount of DNA was determined, the annealing temperature was optimized and the specificity was tested. The *Mycobacterium avium* standard strains preserved by the China Veterinary Culture Collection Center (CVCC) were

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFD0500902)

作者简介: 张 阁, 硕士研究生, 从事人畜共患传染病研究。

通讯作者: 朱良全, E-mail: zhuliangquan9990@hotmail.com; 丁家波, E-mail: dingjiabo@126.com

tested and classified by the optimized multiplex PCR system. The results showed that the reference strain (CVCC 68201) could amplify bands of 577 bp (IS901 gene fragment), 385 bp (IS1245 gene fragment) and 140 bp (dnaJ gene fragment), and the minimum detectable amount of genomic DNA is 0.38 ng/ μ L, the purpose bands can be effectively amplified between the annealing temperature of 50 $^{\circ}$ C ~ 62 $^{\circ}$ C. Twenty - three strains of *Mycobacterium avium* were detected and the *Mycobacterium bovis* was used as negative control. The *Mycobacterium avium* isolates were divided into three categories: *M. avium* subsp. *avium*/*M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Compared with the classification results of China Veterinary Culture Collection Center, our results are not only consistent but also more detailed and of clinical significance. Therefore, the multiplex PCR method based on molecular biology method can rapidly identify the subtype of *Mycobacterium avium* and provide reference for the diagnosis of avium tuberculosis.

Key words: *Mycobacterium avium*; subtype identification; multiplex PCR

禽分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)是一种环境分枝杆菌,在自然界中普遍存在,可从自然来源的水、土壤、植物、垫料中分离得到^[1-2]。禽分枝杆菌能够感染多种禽群,引起以肠道、肝脏和脾脏结核性结节为特征的病变,也可以感染人、猪、牛、羊等动物^[3-5]。禽分枝杆菌具体可分为 4 个亚种,即引起禽结核病的禽分枝杆菌禽亚种(*M. avium* subsp. *avium*, MAA);从环境、人及猪分离出的禽分枝杆菌人猪型亚种(*M. avium* subsp. *hominissuis*, MAH);引起牛羊等反刍动物副结核病的禽分枝杆菌副结核亚种(*M. avium* subsp. *paratuberculosis*, MAP);可导致林鸽禽结核病的禽分枝杆菌森林土壤亚种(*M. avium* subsp. *silvaticum*, MAS)^[6-7]。准确的亚种鉴定对禽结核病的诊断和防控具有重要意义,传统的血清学分型方法不仅耗时、存在安全隐患,而且只能简单的将禽分枝杆菌复合体(*M. avium* complex, MAC)分为禽分枝杆菌和胞内分枝杆菌两大类^[5]。许多基于分子生物学的方法可用于禽分枝杆菌种型的鉴定,目前常用的禽分枝杆菌分型方法主要包括:16S rRNA 测序法^[8]、16S-23S rRNA 间隔区测序法^[9]、限制性片段长度多态性分析法(RFLP)^[10]等,但都存在耗时、判读结果繁琐等缺点。随着研

究的深入,研究人员发现 dnaJ 基因是禽分枝杆菌 4 个亚种中均含有的片段,IS900 基因是禽分枝杆菌副结核亚种(MAP)特有的片段,通过检测 IS901 基因、IS1245 基因和 dnaJ 基因可确定禽分枝杆菌禽亚种(MAA)/禽分枝杆菌森林土壤亚种(MAS)的存在,通过检测 IS1245 基因和 dnaJ 基因可确定禽分枝杆菌人猪亚种(MAH)的存在^[11-12]。2008 年, Moravkova 等^[13]建立了多重 PCR 方法并用于禽分枝杆菌亚型鉴定的研究。鉴于该方法在我国尚未有相关报道,为了加快推进我国禽分枝杆菌流行病学研究并为禽结核病快速诊断奠定基础,本实验结合国外最新的多重 PCR 方法对中国兽医微生物菌种保藏管理中心保存的禽分枝杆菌进行了检测。

1 材料与方法

1.1 菌种及来源 试验中涉及到的 28 个标准菌株均来自国家兽医微生物菌种保藏中心,见表 1。

1.2 试剂、培养基和引物 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;一般 PCR 用 Premix Taq 购自宝生物工程(大连)有限公司;佩氏培养基(Petragnani medium)按照《兽用生物制品规程》(2000 年版)制备^[15]。按照表 2 所示序列^[13],设计的 PCR 引物由中美泰和生物公司合成。

表 1 实验用标准菌株^[14]

Tab 1 Collection strains in this study

菌株名称 Strain	菌株来源 Source	备注 Notation
C68001 (C68-3)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 68001	国内冻干分离株,牛分枝杆菌,制造和检验牛型结核菌素。
C68002 (C68-4)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 68002	国内冻干分离株,牛分枝杆菌,制造和检验牛型结核菌素。
C68021 (C68-11)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 291	英国中央兽医实验室,牛分枝杆菌,制造和检验牛型结核菌素。
C68681 (Ⅲ-V)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 323	英国中央兽医实验室,副结核分枝杆菌,制造副结核菌素。
C68682 (316F)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 1646	国内冻干分离株,副结核分枝杆菌,制造副结核弱毒疫苗。
C68602 (7714)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 1625	国内冻干分离株,副结核分枝杆菌。
C68201 (C69-2)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 68201	国内冻干分离株,血清未定型,制造和检验禽型结核菌素。
<i>M.intracellulare</i> 4	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 281	日本农林省家畜卫生试验场,血清 4 型。
C68204 (C69-5)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 274	国内冻干分离株,血清未定型。
<i>M.intracellulare</i> 6	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 283	日本农林省家畜卫生试验场,血清 6 型。
C68214 (C69-14)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 1610	国内冻干分离株,血清未定型。
C68211 (C69-11)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 1607	国内冻干分离株,血清未定型。
C68205 (C69-1)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 1601	国内冻干分离株,血清未定型。
C68206 (C69-4)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 1602	国内冻干分离株,血清未定型。
<i>M.avium</i> 2	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 279	日本农林省家畜卫生试验场,血清 2 型。
C68212 (C69-12)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 1608	国内冻干分离株,血清未定型。
C68213 (C69-13)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 1609	国内冻干分离株,血清未定型。
C68208 (C69-8)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 1604	国内冻干分离株,血清未定型。
C68207 (C69-6)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 1603	国内冻干分离株,血清未定型。
<i>M.avium</i> Ⅲ	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 277	日本农林省家畜卫生试验场,血清 3 型。
<i>M.avium</i> 1	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 278	日本农林省家畜卫生试验场,血清 1 型。
C68209 (C69-9)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 1605	国内冻干分离株,血清未定型。
<i>M.intracellulare</i> 8	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 284	日本农林省家畜卫生试验场,血清 8 型。
<i>M.avium</i> 3	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 280	日本农林省家畜卫生试验场,血清 3 型。
<i>M.intracellulare</i> 5	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 282	日本农林省家畜卫生试验场,血清 5 型。
C68210 (C69-10)	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 1606	国内冻干分离株,血清未定型。
<i>M.avium</i> Ⅰ	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 275	日本农林省家畜卫生试验场,血清 1 型。
<i>M.avium</i> Ⅱ	国家兽医微生物菌种保藏中心 CVCC 276	日本农林省家畜卫生试验场,血清 2 型。

表 2 合成的引物序列
Tab 2 Primer sequences

基因 Gene	方向 Direction	核苷酸序列 Primer sequence	产物大小 Amplicon size
dnaJ	F	5′ GACTTCTACAAGGAGCTGGG 3′	140 bp
	R	5′ GAGACCGCCTTGAATCGTTC 3′	
IS900	F	5′ TGGTTGCTGTGTTGGATGGC 3′	215 bp
	R	5′ ACCATGCAGTAATGGTCGGC 3′	
IS1245	F	5′ GAGTTGACCGCGTTCATCG 3′	385 bp
	R	5′ CGTCGAGGAAGACATACGG 3′	
IS901	F	5′ GGATTGCTAACCACGTGCTG 3′	577 bp
	R	5′ GCGAGTTGCTTGATGAGCG 3′	

1.3 菌种复苏、繁殖及基因组提取 无菌开启购自国家兽医微生物菌种保藏中心各冻干菌株,分别使用 1 mL 灭菌生理盐水将菌种溶解,接种到预先制备好的佩氏培养基斜面。置 37 ℃ 培养 2~4 周,经肉眼观察长出干燥颗粒状乳酪色菌落后,用生理盐水洗下用于提取基因组 DNA。

1.4 禽分枝杆菌各亚种的多重 PCR 建立

1.4.1 退火温度的优化 以提取的禽结核分枝杆菌参考菌株(CVCC 68201)全基因组 DNA 为模板,以参考文献^[13]设计的 dnaJ、IS900、IS1245 和 IS901 的 4 对引物进行扩增,将退火温度设计成不同温度梯度。反应体系为 20 μL;基因组 1 μL,dnaJ 引物(20 pmol/μL)、IS1245 引物(10 pmol/μL)、IS900(10 pmol/μL)和 IS901(10 pmol/μL)的上下游引物各 1 μL,2×PCR 反应液 Premix Taq 10 μL,灭菌双蒸水 1 μL。反应程序:第一步,96 ℃ 2 min;第二步,96 ℃ 10 s,50 ℃ (52 ℃、54 ℃、56 ℃、58 ℃、60 ℃和 62 ℃) 10 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;第三步,72 ℃ 2 min。PCR 反应结束后,取 10 μL 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,紫外凝胶成像分析系统上观察结果。

1.4.2 多重 PCR 灵敏度(基因组 DNA 最小检测量)的确定 将 1.4.1 项提取的禽结核分枝杆菌参考菌株(CVCC 68201)基因组 DNA 测定浓度后,用双蒸水梯度稀释成 1.5、0.75、0.38、0.19、0.09 和 0.05 ng/μL,用 1.4.1 优化的多重 PCR 进行检测和

电泳,确定其对基因组 DNA 的最小检测量。

1.4.3 多重 PCR 特异性检测

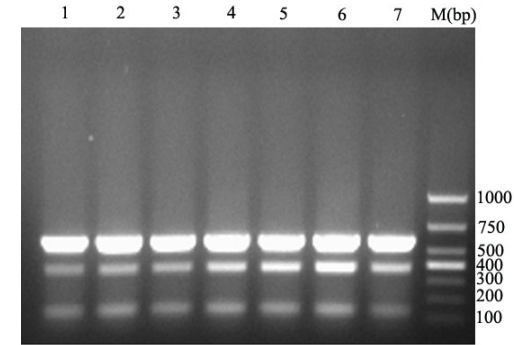
1.4.3.1 禽分枝杆菌各亚种代表性菌株基因组 DNA 提取 提取禽分枝杆菌各亚种代表菌株 CVCC 68201(禽亚种/森林土壤亚种)、CVCC 323(副结核亚种)、CVCC 280(人猪亚种)的基因组 DNA,并选择牛分枝杆菌标准菌株 CVCC 68001、CVCC 68002、CVCC 291 的基因组 DNA 作为对照,运用 1.4.1 优化的多重 PCR 反应体系检测和电泳,确定特异性检测结果。

1.4.3.2 禽分枝杆菌各亚种的多重 PCR 判定标准 多重 PCR 检测的扩增条带呈现 577 bp(IS901 基因片段)、385 bp(IS1245 基因片段)和 140 bp(dnaJ 基因片段)三条目的条带,则判为禽分枝杆菌禽亚种/禽分枝杆菌森林土壤亚种;多重 PCR 检测的扩增条带呈现 385 bp(IS1245 基因片段)和 140 bp(dnaJ 基因片段)两条目的条带,则判为禽分枝杆菌人猪亚种;多重 PCR 检测的扩增条带呈现 215 bp(IS900 基因片段)和 140 bp(dnaJ 基因片段)两条目的条带,则判为禽分枝杆菌副结核亚种。

1.5 多重 PCR 对禽分枝杆菌菌种的鉴定 提取国家兽医微生物菌种保藏中心保存的 23 株禽分枝杆菌基因组 DNA,运用 1.4.1 优化的多重 PCR 反应体系检测和电泳,并根据 1.4.3.2 判定标准进行分类,判定与菌种目录^[14]记载结果的一致性。

2 结 果

2.1 多重 PCR 体系退火温度确定 由图 1 可知,当退火温度设定为 50 ℃~62 ℃时,利用多重 PCR 检测体系均能有效扩增出目的基因,但以 56 ℃~60 ℃的退火温度最佳。

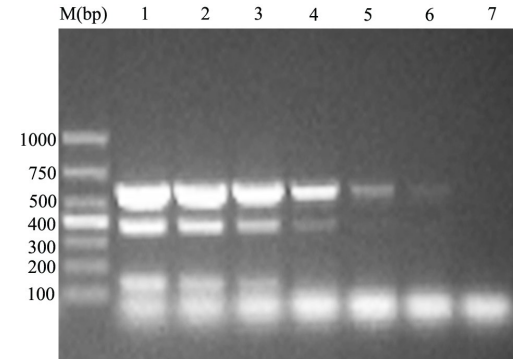


1-7:退火温度依次为 50 ℃、52 ℃、54 ℃、56 ℃、58 ℃、60 ℃和 62 ℃;M: Marker
1-7: annealing temperature is 50 ℃, 52 ℃, 54 ℃, 56 ℃, 58 ℃, 60 ℃ and 62 ℃;M: Marker

图 1 多重 PCR 方法退火温度敏感性测定

Fig 1 Multiplex PCR method for determination of annealing temperature sensitivity

2.2 多重 PCR 灵敏度(最小检测量)结果 由图 2 可知,随着反应体系中模板浓度的降低,多重 PCR 的最低检测限度为 0.38 ng/μL。

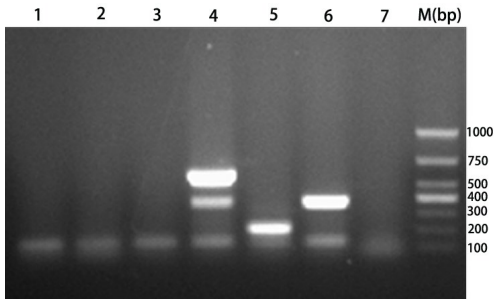


M: Marker;1-7:标准菌株 CVCC 68201 基因组浓度梯度依次为:
1.5 ng/μL、0.75 ng/μL、0.38 ng/μL、0.19 ng/μL、0.09 ng/μL 和 0.05 ng/μL。
M: Marker;1-7: concentration of CVCC 68201 genome concentration:
1.5 ng/μL, 0.75 ng/μL, 0.38 ng/μL, 0.19 ng/μL,
0.09 ng/μL and 0.05 ng/μL

图 2 多重 PCR 方法敏感性检测结果

Fig 2 Multiplex PCR sensitivity test results

2.3 多重 PCR 特异性测定结果 由图 3 看出,牛分枝杆菌仅能扩增出 140 bp 条带,禽分枝杆菌各亚种代表菌株均能扩增出 140 bp 条带,禽亚种/森林土壤亚种扩增出 140 bp、385 bp、577 bp 条带,副结核亚种扩增出 140 bp、215 bp 条带,人猪亚种扩增出 140 bp、385 bp 条带。



1: CVCC 68001;2: CVCC 68002;3: CVCC 291;4: CVCC 68201;
5: CVCC 323;6: CVCC 281;7: 空白对照;M: Marker
1: CVCC 68001;2: CVCC 68002;3: CVCC 291;4: CVCC 68201;
5: CVCC 323;6: CVCC 281;7: negative control;M: Marker

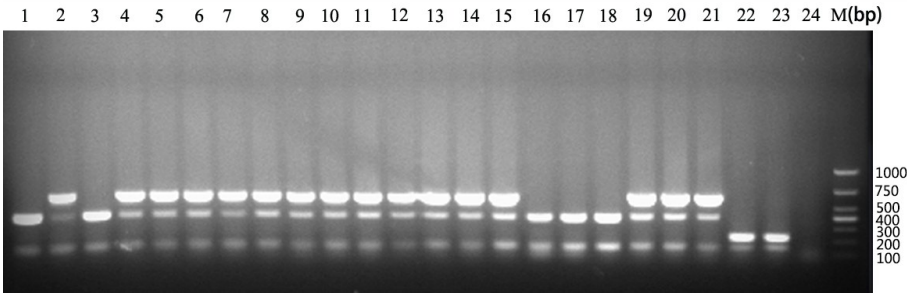
图 3 标准菌株 DNA 的多重 PCR 扩增结果

Fig 3 The results of multiple PCR amplification of DNA of standard strains

2.4 23 株标准菌株的多重 PCR 扩增结果 由图 4 看出,所涉及的 23 株禽分枝杆菌,菌株 CVCC 281、CVCC 283、CVCC 284、CVCC 280、CVCC 282 为人猪亚种,可扩增出 140 bp、385 bp 条带;菌株 CVCC 1646 和 CVCC 1625 为副结核亚种,可扩增出 140 bp、215 bp 条带;其他菌株均为禽亚种/森林土壤亚种,可扩增出 140 bp、385 bp、577 bp 条带。该结果与菌种目录^[14]中记载结果一致。

3 讨 论

多重 PCR 因其快速、灵敏度高等特点尤其适用于禽分枝杆菌这种具有一定生物安全风险的病原鉴定。本实验结合国外最新研究进展^[13]和国内 23 株禽分枝杆菌标准菌株在此方面开展研究,对多重 PCR 特异性进行了验证并确认了最低核酸检测限度 0.38 ng/μL。在实验过程中,多重 PCR 体系采用常规 PCR 商品化 Premix Taq,既实现了目的条带有效扩增又有效避免了 dNTP 浓度、Mg²⁺ 浓度等因素的影响。多重 PCR 技术对退火温度要求很



1: CVCC 281;2: CVCC 274;3: CVCC 283;4: CVCC 1610;5: CVCC 1607;6: CVCC 1601;7: CVCC 1602;8: CVCC 279;9: CVCC 1608;
10: CVCC 1609;11: CVCC 1604;12: CVCC 1603;13: CVCC 277;14: CVCC 278;15: CVCC 1605;16: CVCC 284;17: CVCC 280;
18: CVCC 282;19: CVCC 1606;20: CVCC 275;21: CVCC 276;22: CVCC 1646;23: CVCC 1625;24: 空白对照;M: Marker
1: CVCC 281;2: CVCC 274;3: CVCC 283;4: CVCC 1610;5: CVCC 1607;6: CVCC 1601;7: CVCC 1602;8: CVCC 279;9: CVCC 1608;
10: CVCC 1609;CVCC 1604;17: CVCC 276;14: CVCC 278;15: CVCC 1605;16: CVCC 284;17: CVCC 280;18: CVCC 282;19: CVCC 1606;
20: CVCC 275;21: CVCC 276;22: CVCC 1646;23: CVCC 1625;24: negative control;M: Marker

图 4 23 株标准菌株的多重 PCR 扩增结果

Fig 4 The results of multiple PCR amplification of 23 strains of standard strains

高^[16],考虑到实验室及 PCR 仪不同可能会导致退火温度的差异,从而对多重 PCR 结果产生影响,本试验共设计了 7 个梯度的退火温度(50~62 ℃),均能扩增出特异性目的条带(以 56~60 ℃为最佳),表明该技术具有推广价值。

根据多重 PCR 产物条带情况可以将禽分枝杆菌复合体细分为符合致病性和宿主特点的亚种:禽亚种/森林土壤亚种(140 bp+385 bp+577 bp)、副结核亚种(140 bp+215 bp)、人猪亚种(140 bp+385 bp)。通过多重 PCR 方法还将同为血清 3 型的菌株 CVCC 277 与菌株 CVCC 280 进一步细分为菌株 CVCC 277(禽亚种/森林土壤亚种)与菌株 CVCC 280(人猪亚种),一定程度上弥补了传统血清学分型方法的不足。

该多重 PCR 方法尚不能区分鸟亚种与森林土壤亚种。因为两者基因组 DNA 序列极其相似,即使 16S rRNA 测序等方法也无法区分鸟亚种与森林土壤亚种。也正因为如此,Turenne 等^[17]认为森林土壤亚种就是禽亚种。人们目前只能根据原代培养森林土壤亚种时要添加草分枝菌素等培养特性来实现禽亚种与森林土壤亚种的鉴别^[6]。

鉴于本实验中所用的菌株均为参考菌株,下一步工作仍需收集野外分离株进行验证。另外,该多

重 PCR 方法不能区分禽亚种与森林土壤亚种,将有待进一步研究。

参考文献:

[1] Inderlied C B. The *Mycobacterium avium* complex[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1993, 6(3): 266-310.
[2] Falkinham 3rd J O. Epidemiology of infection by *Nontuberculous mycobacteria*[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1996, 9(2): 177.
[3] Tell L A, Woods L, Cromie R L. Mycobacteriosis in birds[J]. Revue Scientifique Et Technique, 2001, 20(1): 180-203.
[4] Thorel M F, Huchzermeyer H, Weiss R, et al. *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review[J]. Veterinary Research, 1997, 28(5): 439-447.
[5] Mijs W, de Haas P, Rossau R, et al. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and ‘*M. avium* subsp. *hominissuis*’ for the human/porcine type of *M. avium*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(5): 1505-1518.
[6] Thorel M F, Krichevsky M, Lévy-Frédault V V. Numerical taxonomy of mycobactin - dependent *Mycobacteria*, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov[J]. International Journal of System-

- atic and Evolutionary Microbiology, 1990, 40(3): 254–260.
- [7] Hibiya K, Utsunomiya K, Yoshida T, *et al.* Pathogenesis of systemic *Mycobacterium avium* infection in pigs through histological analysis of hepatic lesions[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2010, 74(4): 252–257.
- [8] Tran Q T, Han X Y. Subspecies identification and significance of 257 clinical strains of *Mycobacterium avium* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(4): 1201–1206.
- [9] Pavlik I, Svastova P, Bartl J, *et al.* Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry [J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2000, 7(2): 212–217.
- [10] Johansen T B, Djønn B, Jensen M R, *et al.* Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(5): 2500–2502.
- [11] Bono M, Jemmi T, Bernasconi C, *et al.* Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(1): 371–373.
- [12] Bartos M, Hlozek P, Svastova P, *et al.* Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901 – flanking region PCR with internal standards [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 64(3): 333–345.
- [13] Moravkova M, Hlozek P, Beran V, *et al.* Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues[J]. Research in Veterinary Science, 2008, 85(2): 257–264.
- [14] 康 凯. 中国兽医菌种目录[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2008:70–75.
China Institute of Veterinary Drug Control, China veterinary culture directory[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2008: 70–75.
- [15] 农业部兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程 2000 版[S]. 北京:化学工业出版社,2010: 413–414.
Regulation Committee of China ministry of Agriculture for the Veterinary Biological Products. The People’s Republic of China’s Procedures for the Veterinary Biological Products, 2000 edition [S]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 413–414.
- [16] Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, *et al.* Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol[J]. Biotechniques, 1997, 23(3): 504–511.
- [17] Turenne C Y, Semret M, Cousins D V, *et al.* Sequencing of hsp65 distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(2): 433–440.

(编辑:李文平)