

结核分枝杆菌中的分枝菌酸

孙丕 梅建

(上海市疾病预防控制中心 上海 200336)

肺结核是一种由结核分枝杆菌感染引起的呼吸道传染病,比较容易在密集的人群中传播而导致公共卫生问题。20 多年前肺结核已经得到了基本控制,但是,近年来结核病发病率逐年上升,死灰复燃,又成为全球范围内潜在的致病源,每年可以导致 200 万人死亡。由于无法提供充足的临床药物及不正确的用药方式,出现了耐药性结核。近年来,艾滋病患者合并结核菌感染更是引起了关注,因为艾滋病病人本身脆弱的免疫系统致使他们很容易感染结核菌,而且一旦感染会经常导致死亡。由于结核分枝杆菌的生长、致病性、对药物的耐药性以及抗酸特性都和细胞壁中所含有的分枝菌酸有关。本文从分枝菌酸在细胞壁中的位置、分子结构的多样性、生物合成的过程和抑制分枝菌酸的生物合成的药物异烟肼及其在耐药方面的作用、检测方法等方面进行综述,以期待对分枝菌酸有更深入的了解。

1 分枝菌酸在结核菌细胞壁中的位置

分枝菌酸是 Stodola 等人首次于 1938 年从结核分枝杆菌中提取的不同于常规脂肪酸的 1 种大相对分子量的疏水性的 α -羟基脂肪酸。它区别于其他菌类脂肪酸的特征性化学结构是具有一个碳数为 22~26 个的短臂和一个碳数为 50~60 个的长臂。在结核分枝杆菌的细胞壁中,分枝菌酸和其中的一种重要的多糖-阿拉伯半乳聚糖连接,阿拉伯半乳聚糖通过磷脂键又连接在维持结核菌骨架结构并保持它们的形状的肽聚糖上。分枝菌酸是通过其分子中的羧基与阿拉伯半乳聚糖中的羟基通过酯键垂直连接在阿拉伯半乳聚糖上,而结核菌壁外层的其他糖脂和游离脂类则嵌在分枝菌酸之中^[1](图 1)。这些包含分枝菌酸在内的脂质成分构成了独特的细胞壁结构,由于这层厚厚的疏水性渗透屏障相当紧密,从而能够保护细菌不受外来有毒化学物质的侵害。在这层保护层下,结核分枝杆菌能有效地避开宿主的

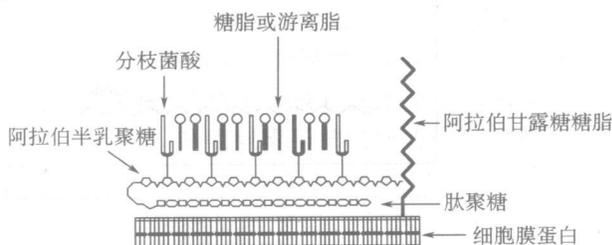


图 1 分枝菌酸在结核菌细胞壁中的位置

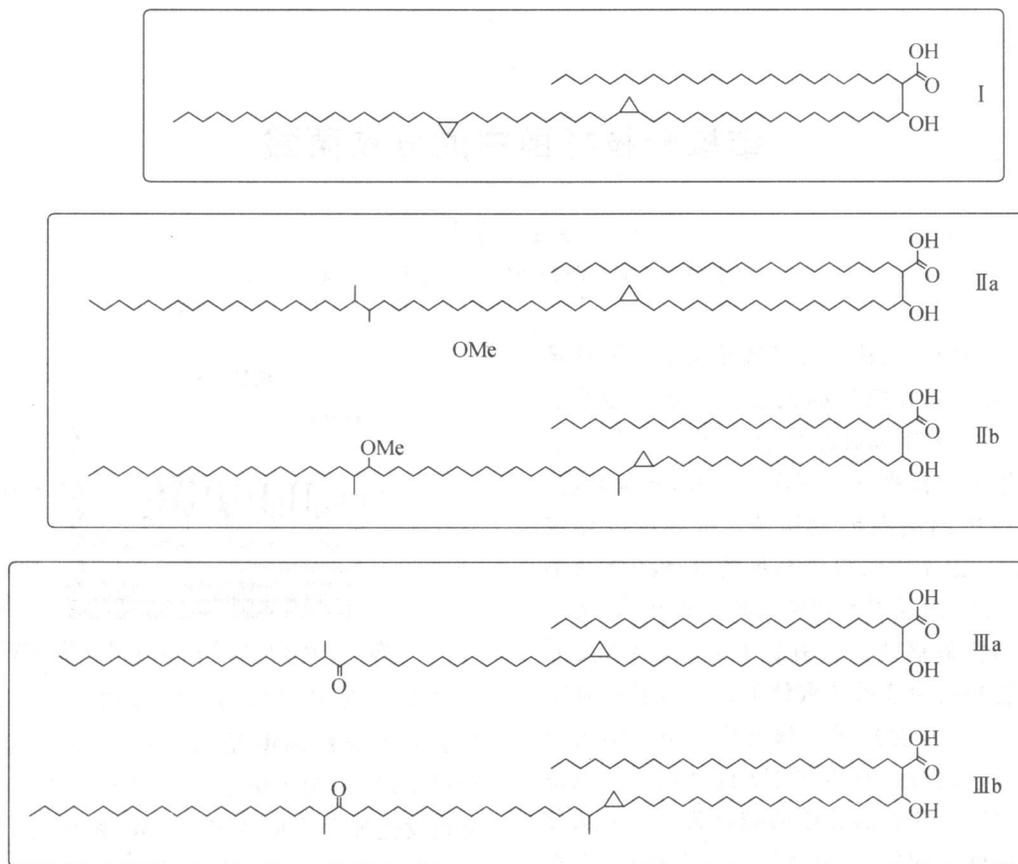
免疫系统,使其很容易在巨噬细胞中生长。这层保护层中的分枝菌酸是结核菌镜检染色实验 Ziehl-Neelsen 以及荧光染色实验中分别和石碳酸酚红及金胺发生显色反应的唯一抗酸物质^[2]。同时不同结构的分枝菌酸还和结核杆菌的毒力相关。

2 分枝菌酸结构的多样性及结构与毒力的关系

分枝菌酸不仅存在于分枝杆菌属中,还存在于诺卡菌属、红球菌属、棒状杆菌属中,是细胞壁中的主要成分,占细胞干重的 40%~60%,结核分枝杆菌的致病性和它相应的细胞壁的结构与成分密切相关。

分枝菌酸的结构是通过 TLC、GC、HPLC 及 NMR 分析技术确定的。不同菌属的菌株中所含的分枝菌酸的碳链的长度是不同的。在棒状杆菌 (*Corynebacterium*) 中,碳链中碳原子的个数在 20~38 之间;在诺卡菌 (*Nocardia*) 中碳链的长度在 40~60 之间。在结核分枝杆菌中,分枝菌酸的典型结构为一个含有羧基和羟基官能团的 60~90 个碳长的线性长链,其中,在羧基的 α 位带着烷基侧链, α 位为羟基,而羧基的 α 位所带的侧链通常是含有 22~24 个碳原子的烷基链。从终端为甲基的碳开始到含有羟基的碳结束的这段碳链称为 meromycolic 链,而另一端则称为 mycocerosic 链。

在结核分枝杆菌中分枝菌酸主要有 3 类结构,即 α -分枝菌酸,酮(keto)-分枝菌酸和甲氧基(me-



I 为 α 分枝菌酸, 它只有顺式结构。II a 与 II b 属于甲氧基类型的分枝菌酸, II a 是顺式, II b 是反式结构。IIIa 和 IIIb 属于酮基分枝菌酸, IIIa 是顺式, IIIb 是反式结构
图 2 Mtb 中分离出的分枝菌酸的化学结构

thoxy) 分枝菌酸(图 2)。极性最小的 α 分枝菌酸的含量是最高的, 而甲氧基和酮基类型的分枝菌酸相对含量较少。在非结核分枝杆菌中还存在有其他结构的分枝菌酸, 如在 *S. smegmatis* 耻垢分枝杆菌中, 就包含有 $\alpha 1$ 、 α' 等类型, 其结构的差异只是分子结构中的环丙烷官能团被双键或环氧丙烷所替代。 α' 型分枝菌酸, 极性稍强, 相对分子量较低, 含 60~68 个碳, 在 TLC 薄层上很容易与 α 分枝菌酸分开^[3]。 α 分枝菌酸含有顺式的环丙烷张力环, 另 2 种类型的分枝菌酸则带有远离羧基端含氧的官能团。这些氧化了的官能团包括酮基、甲氧基团, 它们分别分为顺式和反式结构。这些官能团中, 双键、甲基和环丙烷基属于非极性官能团, 而酮基和甲氧基属于极性官能团。这些官能团的不同极性可引起细胞壁的变化, 如在最远端的环丙烷官能团的存在可以提高结核菌对外界氧化杀伤的耐受力, 同时环丙基的存在也限制了细胞壁的流动性^[4]。

酮基和甲氧基分枝菌酸的存在与否可以明显改变细胞壁的渗透性能, 渗透力的降低使得结核分枝杆菌对生长过程中所使用的特殊的营养成分的利用

度发生改变, 使得结核分枝杆菌的存活率降低, 表现为结核分枝杆菌的毒力减低。这些不同类型的分枝菌酸通过不同的组合构成了具有不同毒力的菌群。值得注意的是, 分枝菌酸的单链上的一个微小的变化, 就可以引起结核杆菌毒力的变化, 如分枝菌酸中的环丙烷被双键替代, 就会影响与海藻糖相连接的索状结构的形成从而影响了其毒力。

3 分枝菌酸的生物合成、相关毒力基因及抑制分枝菌酸的生物合成的药物异烟肼及其耐药的产生

结核分枝杆菌的分枝菌酸的生物合成和其他微生物如酵母真菌等中脂肪酸的生物合成过程既有相似的地方也有其独特的地方。在过去多年研究中, 已经积累了大量的关于分枝菌酸是怎样被合成并组装行变成最后的产物的研究成果, 其生物合成的途径与机理也得到了验证^[5-7]。早在 1977 年 Bloch 和他的同事就证实了在分枝杆菌中存在着对其生物合成起作用的 2 种类型的多功能酶混合体, 即 I 型和 II 型脂肪酸合成酶(FAS-I, FAS-II)。一般认

为,分枝菌酸生物合成的过程大致分为 3 步。第 1 步:FAS I 酶负责以 2 个碳原子的乙酰基团开始,以 2 个碳原子为延长单位不断地延长碳链,直至增加到碳原子数目为 16~ 18 或 20~ 26 个的碳链,这些产物部分成为分枝菌酸的 α 侧链的来源,也就是提供 meromycolic 链,同时它又为 FAS II 体系中继续合成更长的碳链提供了起始化合物。第二步:FAS II 酶参与的链的延长过程,即在前面 FAS I 体系合成的前提化合物的基础上通过 β -ketoacyl ACP 合成酶,脱氢酶,trans enoyl ACP 异构酶环丙烷合成酶、甲基转移酶等的作用,形成了 mycocerosic 长度碳数为 56 个以上的长链,这部分产物为分枝菌酸提供了长链部分。第 3 步:在 PK13 多聚乙酰合成酶的作用下,FAS I 合成的产物作为 α 侧链,FAS II 的产物为长链部分发生 Claisen 缩合反应,合成分枝菌酸。所合成的分枝菌酸怎样连接在海藻糖上形成 TDM 索状结构涉及到一个庞大的体系,还需要许多研究来证明,至今还没有很好的合理的解释。

分枝菌酸生物合成过程中涉及到的一些基因的功能已被证实^[8-13],其中,fab 编码了多功能 FAS I 系统中的酶,acpM, KasA 和 KasB, InhA 主要负责由 FAS I 系统到 FAS II 系统的转换并合成 FAS II 系统中所需的各种功能的合成酶、还原酶、异构酶。MmaA2, PcaA 分别负责 α 分枝菌酸中距离羧基位置的最远端及最近端的环丙烷的形成,PK13 则编码了第 3 步缩合反应中的缩合酶。

在结核分枝杆菌的基因研究的过程中,与分枝菌酸相关的一些功能毒力基因如 Mas (Rv2940c, mas), MmaA4 (Rv0642c, mmaA4), PcaA (Rv0470c, pcaA) 等毒力基因的功能得到了证实^[14]。MmaA4 负责编码分枝菌酸的生物合成过程中的甲基转移化酶,若这个基因发生诱变,诱变体菌株将不产生甲基和酮式分枝菌酸。PcaA 负责分枝菌酸中环丙烷结构形成的甲基转移化酶,在 1 个比较毒力强弱的实验中,被 pcaA 诱变株感染的小鼠的寿命要比野生型结核分枝杆菌感染的长得多。通过对结核分枝杆菌中毒力基因的发现与研究及毒力的分析和测定,为制造更好的类似 BCG 活细胞疫苗、DNA 疫苗等提供了前瞻性的研究。

分枝菌酸的生物合成机理及相关的基因的研究也为抗结核药物的设计提供了有潜力的关键的药物作用靶位。异烟肼作为了一个高效低毒的抗肺结核药物。对结核菌有很高的专一性^[5]。Koch West-er, Kuni Takayama 等人分别设计了一系列实验证

实了异烟肼经结核菌中唯一带有催化活性的催化过氧化酶 KatG 活化后变成的次级产物抑制分枝菌酸的生物合成^[16-18]。Koch 等将 H₃₇Rv 菌株放置在浓度为 0.5 μ g/ml 的异烟肼中处理后发现结核分枝杆菌失去了它的抗酸染色活性。Kuni Takayama 等人采用¹⁴C 标记的分枝菌酸合成时需要的最起点物质乙酰酯,观察和比较了不加入异烟肼和加入异烟肼的结核菌体系中分别合成的带有¹⁴C 标记的中间体浓度随时间的变化,发现加入异烟肼后反应体系中生成的带有放射性标记的化合物的含量显著降低,这些实验结果表明异烟肼抑制了分枝菌酸的生物合成过程,使结核分枝杆菌不能合成细胞壁所需的分枝菌酸,从而阻碍了细胞壁的构建。相反,当结核分枝杆菌产生异烟肼耐药时,至少是 *katG*, *inhA*, *ahpC* 等基因中的 1 个发生了变化。*KatG* 编码的是令异烟肼活化为有效结构的催化过氧化酶,当 *KatG* 发生变化后,异烟肼就无法转化成能够抑制结核分枝杆菌的有效结构,因而产生耐药现象。异烟肼对 *InhA* 的抑制是由于异烟肼和 NADH 形成的加合物可以很“亲合”地结合在 *inhA* 编码的 FAS II 生物合成过程中烯酰还原酶,当 *inhA* 基因变化后,异烟肼和 NADH 的加合物对酶的亲和力急剧减弱,就不能抑制这种酶,因而产生了耐药现象^[19]。其他抑制分枝菌酸合成的药物如乙硫异烟胺^[20] (Ethionamide, ETH) 是 1 个很有用的二线药物,它与异烟肼的结构类似,虽然它和异烟肼在抑制分枝菌酸的合成方面有着同等强度的效力,但对于耐药程度的表现却不尽相同。对于耐异烟肼的菌株对乙硫异烟胺表现出稍微的敏感,但耐乙硫异烟胺的菌株对异烟肼却是敏感的。

4 分枝菌酸的检测方法

由于分枝菌酸是分枝杆菌中独有的成分,且不同类型的分枝杆菌中分枝菌酸的含量和结构类型不同,因此分枝菌酸成了分枝杆菌菌型鉴定中一个非常有用的标记性化合物,它的衍生物在色谱中的不同指纹图谱可被用于菌型分型。同时由于野生型分枝杆菌和诱变体所分泌的分枝菌酸的类型不同,因此分枝菌酸在质谱中的不同表现也常被用于基因的功能研究中。用于分枝菌酸检测的主要色谱方法有薄层色谱法、气相色谱法和液相色谱法及质谱法。

4.1 薄层色谱法^[21-24] 薄层色谱法的原理是根据不同的化合物在展开剂的推进下,化合物与薄层板上的固定相(如硅胶)之间的吸附作用的不同而进行分离的 1 种分析方法。利用薄层色谱法对分枝菌酸

检测的具体方法为: 将培养在 Middlebrook 7H10 或 7H11 上的结核菌中的分枝菌酸在浓硫酸的作用下皂化、甲酯化, 甲酯化的分枝菌酸被有机溶剂萃取出来并浓缩后, 点在高效薄层板上, 再用不同的溶剂展开, 显色后就会有不同 R_f 值的斑点出现在板层上, 由于不同的分枝杆菌中所含的分枝菌酸不同, 因此就会出现一系列不完全相同的斑点图, 利用这些斑点的分布可用来鉴定分枝杆菌的菌种。这种方法需要的仪器设备简单, 而且在同一块薄层板上多个临床菌株可以同时被鉴定, 但由于薄层分离的分离度的影响, 需要培养大量的菌(50 mg 左右), 需要使用几种展开溶剂系统, 喷洒不同的显色剂, 这些不便限制了其在临床上快速检测中的应用。

4.2 气相色谱法 气相色谱法的原理是: 化合物在载气的推动下, 在前进过程中与气相毛细管柱中的填料之间发生不断的吸附-解吸附作用, 从而使不同的化合物得到分离。像鉴定其他细菌一样, 利用气相色谱法根据细胞壁中常规的脂肪酸含量及种类的不同经甲酯化后而给出不同的气相色谱图, 用于判断细菌的类型。同样原理, 也可通过结核菌中的脂肪酸的气相色谱法测定来鉴定结核菌的类型。通过这种方法 Iris 等人对 1 077 株临床菌株进行分型, 符合率为 98.5%^[25-26]。但对于结核菌中的分枝菌酸来说, 由于它的碳链很长, 相对分子量很大, 即使甲酯化后也很难气化, 无法直接进入气相色谱系统。因此只能使用热解或碱性条件下的水解^[27-29], 使大分子从 β 羟基处断裂形成 C24 或 C26 的脂肪酸, 断链后的脂肪酸经甲酯化后进行分析。在热解时需要注意的是裂解的温度和时间, 文献报道随着裂解时间的延长和裂解温度的升高, C24 或 C26 的色谱峰的峰高会增加, 峰形更尖锐, 这不同于普通的短链脂肪酸, 它们的量并不会因为裂解温度的高低或裂解时间的长短而变化。考虑到实验过程中的生物安全问题, Mary A. Lambert^[30] 等人专门比较了活菌直接皂化、甲酯化和高温高压灭菌后再皂化甲酯化得到的分枝菌酸裂解产物的色谱峰的个数及含量, 发现高温高压灭菌对测定是没有影响的。

4.3 液相色谱法 液相色谱法的原理是利用化合物在液体流动相的推动下, 不同的化合物与液相色谱柱中的填料的吸附作用及其在流动相中的分配作用的不同而进行分离。用液相色谱法来检测分枝菌酸的方法自 20 世纪 90 年代开始已逐步成熟起来。由于分枝菌酸链的长度和不饱和度及官能团的不同, 溴化衍生后的分枝菌酸表现在液相图谱上的峰的形状和个数以及峰与峰之间的峰高的比值是不同

的, 不同的结核分枝杆菌菌株中分枝菌酸的类型及含量是不同的, 而同种分枝杆菌给出的液相图谱上的峰的个数及比例是不变的, 因此根据不同的指纹图谱就可以区分不同型的结核菌株^[31]。在用液相色谱法鉴定结核杆菌类型时, 有些研究小组还发现培养温度的不同也是影响结核菌分型的因素之一, 如 *M. Chelonae*. (龟分枝杆菌) 在 28 °C 和 35 °C 下分别培养得到的结核菌株的图谱是不同的, 峰高发生了明显的变化^[32]。

在最初使用液相方法测定分枝菌酸时, 使用的是紫外检测器来识别分枝菌酸的波谱峰, 后来发现分枝菌酸被荧光衍生化后的荧光衍生物的检测灵敏度是紫外吸收法(分枝菌酸被衍生为 *p*-bromophenacyl esters PBPA) 20 多倍^[33], 因此荧光法代替了紫外吸收法, 现在美国疾病预防控制中心推荐使用的 Sherlock 结核杆菌鉴定系统使用的就是液相色谱-荧光检测法。这种方法被广泛被应用于美国多家医院临床菌株的鉴定中。

液相色谱法除了被用来鉴定菌型外, 最近 Nicole Parrish 报道了令人比较感兴趣的工作是通过测定分枝菌酸的浓度变化规律来判断结核菌耐药结果。分枝菌酸的抑制剂异烟肼在短时间内可以引起分枝菌酸相当显著的浓度变化, 结核分枝杆菌在含有异烟肼的培养基中孵育 20 min 之后就可以观察到分枝菌酸浓度的明显下降, 其他药物如利福平、链霉素、乙胺丁醇等, 由于不是分枝菌酸抑制剂不会给出迅速下降的信号, 但培养 5 d 之后, 也能得出相应的变化曲线, 根据不同药物培养基中分枝菌酸的变化趋势判断耐药结果^[34]。这个研究结果也为药物敏感性实验提供了一种新的思路。

4.4 质谱法 以上提到的气相液相液相谱法等方法一般都是根据不同分枝杆菌给出不同的分枝菌酸的色谱图来判断不同菌属的菌株, 但对于分枝菌酸具体的结构无法分析。质谱法为不同结构的分枝菌酸的分析提供了很大的帮助, 它能够提示分枝菌酸具体的种类和质量数, 进而帮助推断更加详细的分枝菌酸的结构。Francoise Laval 等人在进行基因功能的研究时, 利用 MALDI-TOF 质谱法比较了野生的 H₃₇R_v 与它的同基因诱变体(*hma* 基因失活)的菌株中产生的分枝菌酸的变化, 发现诱变株中的分枝菌酸结构发生了明显的变化, 失去了酮基和甲氧基, 正是由于分枝菌酸上这 2 个官能团的失去, 导致细胞壁对小分子化合物的渗透力发生了巨大变化。用诱变菌株感染小鼠时发现它的毒力也明显减弱。由此可以看出分枝菌酸的质谱分析为毒力基因的功能

研究提供了有力的工具^[35]。

5 结束语

分枝菌酸的生物合成机理及相关的基因的研究为抗结核药物的设计提供了有潜力的关键的药物作用靶位^[36]。随着对与细胞壁形成有关的生物化学过程的理解,在分枝菌酸生物合成过程中涉及到的许多酶成了可进一步研究探索的靶点。例如对分枝菌酸生物合成过程中的酶有抑制作用的著名的新抗结核药物 PA-824,它是从一个含有 328 个化合物的库中筛选出来的非常有潜力的抗耐药结核药物。目前该药物已进入临床试验阶段。尽管新的抗结核药物产生的过程是艰难和漫长的,但随着结核杆菌功能基因的研究、计算机模拟药物化学、酶学及有机合成技术的不断发展,更有效的抗结核新药一定会不断产生。

6 参考文献

[1] Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 1997, 1 (4): 579- 588

[2] Richards OW. The staining of acid fast tubercle bacteria [J]. *Sci*, 1941, 93: 190

[3] George KM, Yuan Y, Sherman DR, Barry CE III. The biosynthesis of cyclopropanated mycolic acid in mycobacterium tuberculosis [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(45): 27292- 27298

[4] Yuan Y, Lee RE, Besra G. S, Belisle JT, Barry CE III. Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(14): 6630 - 6634

[5] Takayama K, Wang C, Besra GS. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(1): 81- 101.

[6] Schweizer E, Hofmann J. Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68(3): 501- 517.

[7] Bhatt A, Mølle V, Besra GS, Jacobs WR Jr, Kremer L. The *Mycobacterium tuberculosis* FAS II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid fastness, pathogenesis and in future drug development [J]. *Mol Microbiol*, 2007, 64(6): 1442- 1454

[8] Gao LY, Laval F, Lawson EH, Groger RK, Woodruff A, Morisaki JH, Cox JS, Daffe M, Brown EJ. Requirement for kasB in *Mycobacterium* mycolic acid biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy [J]. *Mol Microbiol*, 2003, 49(6): 1547- 1563

[9] Mduli KR, Slayden A, Zhu Y, Ramaswamy S, Pan X, Mead D, Crane DD, Musser JM, Barry CE III. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* β -ketoacyl ACP synthase by isoniazid [J]. *Sci*, 1998, 280 (5369): 1607- 1610

[10] Dessen A, Quemard A, Blanchard JS, Jacobs WR, Sacchettini JC,

Crystal structure and function of the isoniazid target of in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Sci*, 1995, 267(5204): 1638- 1641

[11] Glickman MS. The mmaA2 gene of *Mycobacterium tuberculosis* encodes the distal cyclopropane synthase of the α mycolic acid [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(10): 7844- 7849

[12] Glickman MS, Cahill SM, Jacobs WR Jr. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for coding persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Mol Cell*, 2000, 5 (4): 717- 727.

[13] Portevin D, De Sousa D'Auria C, Houssin C, Grimaldi C, Charmi M, Daffe M, Guilhot C. A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(1): 314- 319

[14] Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16 (3): 463- 496

[15] Clifton E, Barry III, Mduli K. Drug sensitivity and environmental adaptation of mycobacterial cell wall components [J]. *Trends Microbiol*, 1996, 4: 275- 281

[16] Kochr Wester D, Ebert RH, Barclay WR, Lee VS. Studies on the metabolic significance of acid fastness of tubercle bacilli [J]. *J Lab Clin Med*, 1953, 42: 828- 829

[17] Takayama K, Wang L, David HL. Effect of isoniazid on the vivo mycolic acid synthesis, cell growth and viability of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1972, 2(1): 29- 35

[18] Quémard A, Lacave C, Lanéelle G. Isoniazid inhibition of mycolic acid synthesis by cell extracts of sensitive and resistant strains of mycobacterium aurum [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, 35(6): 1035- 1039

[19] Kruh NA, Rawat R, Ruzsicska BP, Tonge P J. Probing mechanisms of resistance to the tuberculosis drug isoniazid: conformational changes caused by inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Prot Sci*, 2007, 16(8): 1617- 1627.

[20] Phetsuksiri B, Baulard A, Cooper A, Minnikin DE, Douglas JD, Besra GS, Brennan PJ. Antimycobacterial activities of isoxyl and new derivatives through the inhibition of mycolic acid synthesis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43 (5): 1042- 1051

[21] Lévy frébault V, Goh KS and David HL. Mycolic acid analysis for clinical identification of mycobacterium avium and related mycobacteria [J]. *J Clin Microbiol*, 1986, 24(5): 835- 839.

[22] Ikawa H, Oka S, Murakami H, Hayashi A, Yano I. Rapid identification of serotypes of mycobacterium avium M. intracellulare complex by using infected swine sera and reference antigenic glycolipids [J]. *J Clin Microbiol*, 1989, 27 (11): 2552- 2558

[23] Bosne S, Lévy frébault V. Mycobactin analysis as an aid for the identification of mycobacterium fortuitum and mycobacterium chelonae subspecies [J]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(5): 1225- 1231.

- [24] Portaels F, Dawson DJ, Larsson L, Rigouts L. Biochemical properties and fatty acid composition of mycobacterium haemophilum: study of 16 isolates from Australian patients [J]. J Clin Microbiol, 1993, 31(1): 26- 30
- [25] Ozbek A, Aktas O. Identification of three strains of mycobacterium species isolated from clinical samples using fatty acid methyl ester profiling [J]. J Intl Med Res, 2003, 31(2): 133- 140
- [26] Smid I, Salfinger M. Mycobacterial identification by computer-aided gas liquid chromatography [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 1994, 19(2): 81- 88.
- [27] Dworzanski JP, Berwald L, Meuzelaar HLC. Pyrolytic methylation gas chromatography of whole bacterial cells for rapid profiling of cellular fatty acids [J]. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(6): 1717- 1724
- [28] Alugupalli S, Sikka MK, Larsson L, White DC. Gas chromatography-mass spectrometry methods for the analysis of mycobactericidal acids present in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Microbiol Methods, 1998, 31(3): 143- 150
- [29] Luquin M, Lopez F, Ausina V. Capillary gas chromatographic analysis of mycolic acid cleavage products, cellular fatty acids, and alcohols of mycobacterium xenopi [J]. J Clin Microbiol, 1989, 27(6): 1403- 1406
- [30] Lambert MA, Moss CW, Silcox VA, Good RC. Analysis of mycolic acid cleavage products and cellular fatty acids of mycobacterium species by capillary gas chromatography [J]. J Clin Microbiol, 1986, 23(4): 731- 736.
- [31] Kellogg JA, Bankert DA, Withers GS, Sweimler W, Kiehn TE, Pfyffer GE. Application of the Sherlock mycobacteria identification system using high performance liquid chromatography in a clinical Laboratory [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(3): 964- 970
- [32] Butler WR, Kilburn JO. High performance liquid chromatography patterns of mycolic acid as criteria for identification of mycobacterium chelonae, mycobacterium fortuitum and mycobacterium smegmatis [J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(9): 2094- 2098
- [33] Hagen SR, Thompson JD. Analysis of mycolic acids by high performance liquid chromatography and fluorimetric detection: implication for the identification of mycobacterium heidelbergense sp nov. [J]. J Chromatogr, 1995, 672(1- 2): 167- 172
- [34] Parrish N, Osterhout G, Dionne K, Sweeney A, Kwiatkowski N, Carroll K, Jost KC Jr, Dick J. Rapid, standardized method for determination of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility by use of mycolic acid analysis [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(12): 3915- 3920
- [35] Laval F, Lanéelle M-A, Deón C, Monsarrat B, Daffé M. Accurate molecular mass determination of mycolic acids by MALDI-TOF mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2001, 73(18): 4537- 4544
- [36] Ballell L, Field RA, Duncan K, Young RJ. New small molecule synthetic antimycobacterials [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(6): 2153- 2163

(收稿日期: 2009- 11- 9)

(本文编辑: 张晓进)

• 通知 •

中国防痨协会临床委员会、基础委员会 学术研讨会征文通知

中国防痨协会结核病临床专业委员会、基础细菌免疫专业委员会定于 2010 年 10 月 15—18 日在上海召开专题学术研讨会, 主题为“结核病诊疗新进展”。自即日起征集学术交流论文。

1. 征文内容: 中国结核病控制策略和方法; 结核病基础、临床、流行病学; 健康教育; 护理; 抗结核药物; 结核病诊断与疫苗; 耐药结核病; 流动人口结核病防治; TB/HIV 双重感染的国内外进展、科研成果和我国结核病防治工作实施经验, 呼吸系统疾病及吸烟与健康等相关内容。

2. 征文要求: (1) 所送论文均应为未公开发表的论文。(2) 文责自负, 征文文字应准确无误。一律为电子版。电子版发至下述邮箱(以 Word 格式存盘)。论文纸质版 1 份附单位介绍信并盖章, 注明为会议交流征文; (4) 务必写清第一作者姓名、工作单位、通讯地址、邮政编码、联系电话。截稿日期为 2010 年 8 月 31 日。

3. 凡参加本次学术会议的论文, 经审稿后将刊载于《中国防痨杂志》2010 年专刊上。论文评审费 160 元。版面费按正刊标准收取。评审费请寄北京西城区东光胡同 5 号(100035)《中国防痨杂志》编辑部。

4. 联系地址和方法: (1) 北京西城区东光胡同 5 号(100035), 中国防痨杂志编辑部, 信封上注明“征文”字样。(2) 联系人: 李树萍、丁北川。(3) 联系电话(传真): (010) 62257587(李树萍); (010) 62276766- 1214(丁北川); (4) Email: zgflxh@126.com。