

· 论 著 ·

结核分枝杆菌复苏因子对结核性胸腔积液中
结核分枝杆菌生长促进作用的探索邢爱英 刘忠泉 杜博平 孙琦 贾红彦 魏荣荣 刘洋
曹廷明 杜凤娇 古淑香 马珣 张宗德

【摘要】 目的 探讨结核分枝杆菌复苏因子(resuscitation promoting factor, Rpf)对结核性胸腔积液中病原菌生长的促进作用,以期提高临床标本体外培养阳性率,缩短培养时间。**方法** 选择 2012 年 10 月至 2013 年 10 月期间北京胸科医院 62 例结核性胸膜炎患者,抽取胸腔积液经过离心处理后分别接种于改良罗氏培养基,以及含高、低浓度 Rpf 的 MiddleBrook 7H11 固体培养基(简称“7H11 培养基”)和生理盐水 7H11 培养基(生理盐水阴性对照组)中,每隔 3 d 观察菌落形成情况,阳性者行抗酸染色(AFB)、PCR 扩增试验及 DNA 测序进行菌种鉴定,观察比较高、低浓度 Rpf 对 Mtb 的促进生长作用。利用统计软件 SPSS 17.0 进行统计学分析。Rpf 培养组与改良罗氏培养组,以及 Rpf 培养组与生理盐水阴性对照组 Mtb 培养阳性率比较采用配对计数资料的 χ^2 检验;不同浓度 Rpf 培养组与生理盐水阴性对照组可视菌落平均时间(d)和阳性菌落数量比较采用配对样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。**结果** (1)结核性胸腔积液改良罗氏培养组中的 Mtb 培养阳性率为 16.1%(10/62),含 Rpf 的 7H11 培养基中的 Mtb 培养阳性率为 43.5%(27/62),两者比较差异具有统计学意义($\chi^2 = 12.84, P < 0.01$);(2)含高、低浓度 Rpf 7H11 培养基的可视菌落形成时间各为 (20.92 ± 0.58) d 和 (21.69 ± 0.50) d,两组间差异无统计学意义($t = 0.085, P > 0.05$),但显著快于生理盐水对照组(不含 Rpf)的 (38.08 ± 0.94) d(t 值分别为 10.19、9.91, P 值均 < 0.001);(3)含高、低浓度 Rpf 的 7H11 培养基菌落形成单位数各为 $(34.12 \pm 4.06) \times 10^2$ 和 $(37.27 \pm 5.63) \times 10^2$,两组间差异无统计学意义($t = 0.45, P > 0.05$),但显著多于生理盐水对照组 $(3.77 \pm 0.88) \times 10^2$ (t 值分别为 5.88、7.30, P 值均 < 0.001)。**结论** 接种结核性胸腔积液后,含 Rpf 的 7H11 培养基较改良罗氏培养基可提高 Mtb 的培养阳性率,并缩短培养时间。

【关键词】 结核分枝杆菌; 复苏因子; 培养; 比较研究

A study on the growth-promoting effect for *Mycobacterium tuberculosis* from tuberculous pleural effusion with resuscitation promoting factors XING Ai-ying, LIU Zhong-quan, DU Bo-ping, SUN Qi, JIA Hong-yan, WEI Rong-rong, LIU Yang, CAO Ting-ming, DU Feng-jiao, GU Shu-xiang, MA Yu, ZHANG Zong-de. Laboratory of Molecular Biology, Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, Beijing 101149, China
Corresponding author: ZHANG Zong-de, Email: ZZD417@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the growth-promoting effect of resuscitation promoting factors(Rpf) for *Mycobacterium tuberculosis*(Mtb) from pleural effusion in order to improve culture rate and short culture time of Mtb from clinical samples. **Methods** Sixty-two patients with tuberculous pleurisy who admitted in Beijing Chest Hospital from Oct. 2012 to Oct. 2013 were recruited. Pleural effusion drained from every patient was centrifuged and inoculated on Löwenstein-Jenson(L-J) media, MiddleBrook 7H11 containing with high- or low-concentration Rpf and 0.9% saline(as negative control). Colony formation unit(CFU) was observed every 3 days. Acid-fast bacilli(AFB), PCR and DNA sequencing for isolation identification were performed when colony formation was positive. Growth-promoting effect of Mtb were compared between media containing high- and low- concentration Rpf. Statistical analysis was performed using the software of SPSS version 17.0. Culture positive rate in different group was analyzed with Chi-square test. The average time of visible colonies and positive colonies were analyzed with paired sample t test. **Results** (1) The culture positive rates of Mtb on L-J medium and 7H11 medium containing Rpf were 16.1%

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2014.05.014

基金项目:首都卫生发展科研专项项目(2011-1010-01);北京市优秀人才培养资助项目(2013D003034000038)

作者单位:101149 北京市结核病胸部肿瘤研究所分子生物学实验室

通信作者:张宗德,Email: ZZD417@163.com

注:刘忠泉为并列第一作者

(10/62) and 43.5% (27/62), respectively. It was a statistically significant difference ($\chi^2=12.84, P<0.01$). (2) The average colony formation time for isolates was $(20.92 \pm 0.58)\text{d}$ and $(21.69 \pm 0.50)\text{d}$ on 7H11 media containing high- and low-concentration of Rpf, respectively. There was no significant difference ($t=0.085, P>0.05$). However, it was more faster than that of negative controls, (38.08 ± 0.94) ($t=10.19, t=9.91, P<0.001$). (3) The number of CFU on the 7H11 media containing high- or low-concentration Rpf were $(34.12 \pm 4.06) \times 10^2$ and $(37.27 \pm 5.63) \times 10^2$, respectively, There was no significant difference statistically ($t=0.45, P>0.05$). But both of them were much more than the negative controls $(3.77 \pm 0.88) \times 10^2$ with statistically significant difference ($t=5.88, t=7.30, P<0.001$). **Conclusion** MiddleBrook 7H11 medium containing Rpf is an ideal culture medium to improve culture positive rate for Mtb from the tuberculosis pleurisy effusion and short culture time.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Resuscitation promoting factor; Culture; Comparative study

肺外结核在我国是一种较为常见的结核病,结核性胸膜炎发生率在肺外结核中位居第二,占胸腔积液的 54.87% 以上。结核性胸膜炎常因诊断不及时而导致肺压缩或胸廓变形,从而严重影响患者的呼吸功能和生活质量。在肺外结核中,由于环境对结核分枝杆菌(Mtb)生长不利,标本中 Mtb 大部分处于休眠或受损状态,导致结核性胸膜炎患者胸腔积液中 Mtb 检出率低。目前,细菌学仍是结核性胸膜炎诊断的金标准,而临床分离菌株的药敏试验又是指导结核性胸膜炎正确治疗的依据,因此提高胸腔积液 Mtb 培养阳性率是及时诊断和治疗结核性胸膜炎的关键。Mukamolova 等及 Zhang 等^[1-2]研究表明,结核分枝杆菌复苏因子(resuscitation promoting factor, Rpf)蛋白能刺激休眠菌复苏、繁殖,该蛋白在皮摩尔(pmol)浓度下即可促进低浓度接种到培养基上的细菌快速生长繁殖,并可促进休眠 Mtb 生长。笔者前期进行了脊柱结核脓液标本 Mtb 复苏培养,结果表明 Rpf 能有效地促进脓液标本中的 Mtb 快速生长,提高 Mtb 培养阳性率^[3]。因此,本研究将 62 例结核性胸腔积液标本离心处理后分别接种于改良罗氏培养基,以及含高、低浓度 Rpf 的 MiddleBrook 7H11 固体培养基(简称“7H11 培养基”)和生理盐水 7H11 培养基(生理盐水阴性对照组)中,阳性者行抗酸染色(AFB)、PCR 扩增试验及 DNA 测序进行菌种鉴定,观察比较高、低浓度 Rpf 对 Mtb 的促进生长作用,并在此基础上建立一种结核性胸腔积液 Mtb 的复苏培养方法,进一步探讨 Rpf 对休眠菌的复苏和促生长作用。

材料和方法

一、实验材料和仪器

1. 标本来源:62 例胸腔积液标本来源于 2012 年 10 月至 2013 年 10 月期间本院住院且经 B 超定位需抽取胸腔积液的结核性胸腔积液患者,62 例患者均符合《临床诊疗指南 结核病分册》^[4] 结核性胸膜炎的诊断标准;临床上已排除其他病因;经病理或

细菌培养证实明确诊断为结核性胸膜炎,在随后观察中对抗结核治疗有效。其中男 45 例,年龄范围 6~87 岁,平均年龄 (40.33 ± 22.61) 岁;女 17 例,年龄范围 14~60 岁,平均年龄 (33.18 ± 15.00) 岁。本研究经本院伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。Mtb 标准株 H37Rv 为本实验室保存。

2. 相关仪器来源:PCR 扩增仪(Bio-Rad, 美国);DYY8B 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂);凝胶成像分析系统(Bio-Rad, 美国);CLASS II TYPE A2 生物安全柜(北京东联哈尔滨仪器制造有限公司)。

3. 相关试剂来源:(1)结核分枝杆菌复苏因子 Rpf B(Rv1009)、Rpf E(Rv2450c)重组蛋白:本实验室自备^[5]。(2)本实验 7H11 培养基的制作:将 MiddleBrook 7H11 基础培养基(美国 Becton Dickinson 公司)4.2 g 加入 180 ml 双蒸馏水中,再加入 1.0 ml 甘油,120 °C ~ 124 °C 高压 15 min,冷却至 50 °C ~ 55 °C 时加入 OADC(油酸-牛血清白蛋白-葡萄糖-过氧化氢酶,oleic acid-albumin-dextrose-catalase) 20 ml,并加入一定浓度的抗生素(培养基内各抗生素的终浓度分别为:氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、羧苄青霉素 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、可溶性多黏菌素 B 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、可溶性两性霉素 B 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$),混匀后取 10 ml 分别倒入 20 个培养平板中,4 °C 保存备用。(3)改良罗氏培养基由本单位结核病临床实验室制备^[6]。(4)抗酸染色试剂:珠海贝索生物技术有限公司产品。(5)DNA 提取试剂盒(Qiagen, 美国)。

二、实验方法

1. 标本的处理(碱处理-中和离心沉淀法):无菌抽取每例结核性胸膜炎患者胸腔积液 100 ml,分装于 50 ml 无菌离心管中,3000 \times g 离心 20 min 后弃去部分上清,管底部留下 10 ml,加入 1 倍体积的 4% 氢氧化钠(NaOH),涡旋振荡,待标本均匀液化后加入 20 ml 的 0.067 mol pH 值为 6.8 的磷酸缓冲液(PBS)混匀(20 min 内完成);3000 \times g 离心 30 min,

弃去上清,沉淀加入 0.5 ml PBS 混匀备用。

2. 改良罗氏培养基培养 Mtb:62 例结核性胸膜炎患者胸腔积液标本同时行改良罗氏培养,作为改良罗氏培养组。取 100 μ l 标本处理液接种到改良罗氏培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养箱培养,于第 3 天观察无污染后,每 3 天定期观察并记录结果,每批实验同时设加无菌生理盐水 100 μ l 的对照和 100 μ l Mtb 标准株 H37Rv 的阳性对照作为质量控制。结果鉴定按 2006 年中国防痨协会公布的《结核病诊断实验室检验规程》^[6] 进行。

3. 含高、低浓度 Rpf 的 7H11 培养基培养 Mtb:为 Rpf 培养组,分为高浓度 Rpf 培养组 62 例,低浓度 Rpf 培养组 62 例。每份标本分别接种 3 个 7H11 培养基平板之中:高浓度(Rpf B:137 nmol,Rpf E:121 nmol)和低浓度(Rpf B:1.4 nmol,Rpf E:1.2 nmol)的复苏因子蛋白分别和 100 μ l 处理标本混匀,生理盐水对照组加入 100 μ l 生理盐水和 100 μ l 处理标本,接种棒均匀涂布,37 $^{\circ}$ C 培养箱培养,于第 3 天观察无污染后,每 3 天定期观察并记录结果,且 2 名工作人员同时背靠背观察记录,取平均值。以肉眼可见菌落标记为阳性菌落,培养 60 d 后停止菌落计数和培养时间的记录。每批实验同时设加无菌生理盐水 100 μ l 的对照和 100 μ l Mtb 标准株 H37Rv 的阳性对照作为质量控制。

4. 细菌学鉴定(AFB 涂片镜检方法):具体操作参见参考文献^[6]。适量刮取 7H11 及改良罗氏培养基培养菌落,加入 0.5 ml 1 \times PBS(pH 值为 6.8)研磨,取 10 μ l 上述处理液涂于载玻片上,直径为 0.5 cm 范围,1 份标本同时做 2 张涂片,紫外线过夜自然干燥固定,萋-尼染色,玻片干燥后 100 \times 油镜下观察结果。

5. 培养物的菌种鉴定:以 PCR 扩增进行菌种鉴定。(1)操作步骤:适量刮取 7H11 及改良罗氏培养菌落加入 1 ml 1 \times PBS,研磨后 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min,用 Qiagen DNA 提取试剂盒提取 DNA,取 1 μ l 行 PCR 扩增,所用 16S rRNA 引物序列:F:5'-AGAG-TTTGATCCTGGCTCAG-3';R:5'-CCCCGTCAA-TTCATTTGAGTTT-3'。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 变性 5 min;扩增 95 $^{\circ}$ C 1 min,66 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 同时设 H37Rv 标准株 DNA 为阳性对照和灭菌去离子水为阴性对照。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳证实有目的产物条带 800 bp 为 Mtb。(2)结果的判定:PCR 扩增产物测序进行菌种鉴定,PCR 扩增产物由北京擎科生物技术有限公司进行测序,并将测序结

果与 16S rRNA 标准序列比对判定是否为 Mtb。

三、数据的统计学分析

利用统计软件 SPSS 17.0 进行统计学分析。Rpf 培养组与改良罗氏培养组及 Rpf 培养组与生理盐水对照组 Mtb 培养阳性率比较采用配对计数资料的 χ^2 检验;不同浓度 Rpf 培养组与生理盐水对照组可视菌落平均时间(d)和阳性菌落数量比较采用配对样本 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同培养条件中培养阳性率的比较:7H11 培养基 Rpf 培养组 Mtb 阳性率为 43.5%(27/62),改良罗氏培养组 Mtb 阳性率为 16.1%(10/62);两组比较差异有统计学意义($\chi^2=12.84,P<0.01$),具体见表 1。7H11 培养基 Rpf 培养组阳性可视菌落平均时间(21.10 \pm 2.69) d,改良罗氏培养组阳性可视菌落平均时间(40.50 \pm 2.76) d,两组比较差异有显著统计学意义($\chi^2=17.36,P=0.000$)。

表 1 Rpf 培养组与改良罗氏培养组 Mtb 培养阳性结果比较(例)

Rpf 培养组	改良罗氏培养组		合计
	+	-	
+	10	17	27
-	0	35	35
合计	10	52	62

2. 7H11 培养基 Rpf 培养组和生理盐水对照组 Mtb 阳性率的比较:62 例结核性胸腔积液 Rpf 培养组 Mtb 阳性率为 43.5%(27/62),生理盐水对照组 Mtb 阳性率为 21.0%(13/62),两组比较差异有统计学意义($\chi^2=11.13,P<0.01$)。

3. 高、低浓度 7H11 培养基 Rpf 培养组和生理盐水对照组可视菌落平均时间(d)的比较:具体见表 2,图 1。高浓度 Rpf 培养组 Mtb 阳性率为 43.5%(27/62),阳性可视菌落平均时间为(20.92 \pm 0.58) d;

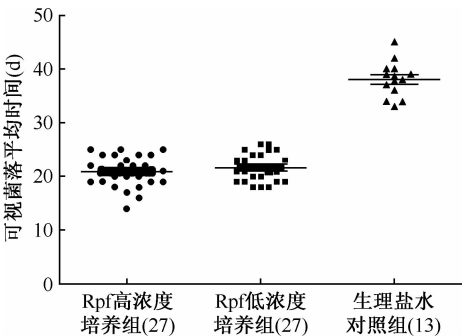


图 1 高、低浓度 Rpf 培养组和生理盐水对照组 可视菌落平均时间(d)的比较

低浓度 Rpf 培养组 Mtb 阳性率为 43.5%(27/62), 阳性可视菌落平均时间为(21.69±0.50) d, 两组比较差异无统计学意义($t=0.085, P>0.05$)。生理盐水对照组阳性可视菌落平均时间为(38.08±0.94) d, 与高、低浓度 Rpf 培养组比较差异有显著统计学意义(t 值分别为 10.19、9.91, P 值均<0.001)。

4. 高、低浓度 7H11 培养基 Rpf 培养组和生理盐水对照组阳性菌落数量的比较: 具体见表 2, 图 2。高浓度 Rpf 培养组菌落形成单位(colony-forming unit, CFU)为(34.12±4.06)×10², 低浓度 Rpf 培养组 CFU 为(37.27±5.63)×10², 两组菌落形成数量比较差异无统计学意义($t=0.45, P>0.05$)。生理盐水对照组 CFU 为(3.77±0.88)×10², 与高、低浓度 Rpf 培养组比较差异有显著统计学意义(t 值分别为 5.88、7.30, P 值均<0.001)。

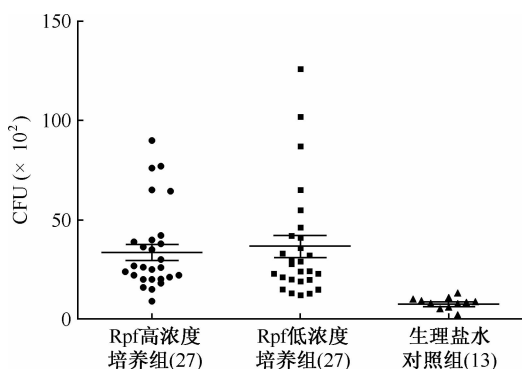


图 2 高、低浓度 Rpf 培养组和生理盐水对照组阳性菌落数量的比较

表 2 高、低浓度 7H11 培养基 Rpf 培养组和生理盐水对照组可视菌落平均时间(d)和阳性菌落数量(CFU)比较

组别	总标本(例)	可视菌落平均时间(d)	阳性菌落数量(CFU)
7H11 培养基 Rpf 高浓度培养组	62	20.92±0.58	(34.12±4.06)×10 ²
7H11 培养基 Rpf 低浓度培养组	62	21.69±0.50	(37.27±5.63)×10 ²
生理盐水对照组	62	38.08±0.94	(3.77±0.88)×10 ²

5. 培养阳性菌落的细菌学和分子生物学鉴定结果: (1) 高、低浓度 7H11 培养基 Rpf 培养组各 27 例阳性菌落和生理盐水对照组 13 例阳性菌落以及罗氏培养组 10 例阳性菌落研磨后涂片行抗酸染色, 100 倍油镜下观察均可见红色抗酸杆菌。(2) 对两种方法培养菌落提取 DNA, 应用 H37Rv 特异性引物 16S rRNA 进行 PCR 扩增, 电泳显示上述抗酸染

色为阳性的菌落 PCR 产物均出现目的片段, 表明培养菌落均为 Mtb。(3) 进一步对上述 PCR 扩增产物进行测序分析: 高、低浓度 7H11 培养基 Rpf 培养组各 27 例阳性菌落和 13 例生理盐水对照组阳性菌落及罗氏培养组 10 例阳性菌落均为 Mtb。

6. 最适宜的 Rpf 培养浓度: 根据高、低浓度 7H11 培养基 Rpf 培养组胸腔积液的 Mtb 培养阳性率, 高浓度 Rpf 培养组为 43.5%(27/62), 低浓度 Rpf 培养组为 43.5%(27/62); 可视菌落平均时间: 高浓度 Rpf 培养组为(20.92±0.58) d; 低浓度 Rpf 培养组为(21.69±0.50) d; CFU 计数: 高浓度 Rpf 培养组为(34.12±4.06)×10²; 低浓度 Rpf 培养组为(37.27±5.63)×10², 提示 Rpf 高浓度(Rpf B: 137 nmol, Rpf E: 121 nmol)和 Rpf 低浓度(Rpf B: 1.4 nmol, Rpf E: 1.2 nmol)对结核性胸腔积液中的休眠的 Mtb 具有相同的复苏和促生长作用。提示 Rpf B 在 1.4~137 nmol 之间、Rpf E 在 1.2~121 nmol 之间为 Rpf 培养适宜浓度。

讨 论

结核性胸膜炎是 Mtb 由近胸膜的原发病灶直接波及胸膜, 或经血液、淋巴循环途径传播至胸膜而引起的渗出性炎症。大量的胸腔积液降低了 Mtb 的浓度, 且 Mtb 因长期缺少营养和氧气而处于休眠状态, 从而导致胸腔积液 Mtb 体外培养阳性率极低。虽然胸腔镜检查及活检组织 Mtb 培养阳性率可达 61.1%^[7], 但因具有一定的创伤性而不能成为常规检查; 胸腔积液标本结核分枝杆菌快速培养(BACTEC MGIT 960 液体培养法)虽然将培养的时间可缩短至 14 d 左右, 但昂贵的仪器和试剂难以在结核病多发的贫困地区推广。因此建立一种能提高胸腔积液中 Mtb 培养阳性率、缩短培养时间的新方法尤其重要。

生长活跃的富含碱基 G+C 的革兰阳性菌能产生一种能使休眠的同源菌重新活跃的小相对分子质量蛋白质 Rpf, 相对分子质量在 16 000~17 000。有作者认为 Rpf 的作用机制是通过切割仅存在于休眠菌细胞壁上的对细胞生长分裂有物理阻碍作用的肽聚糖, 从而使休眠菌恢复生长^[8-9]。Mtb 表达 5 种 Rpf 蛋白, 即 Rpf A(Rv0867c)、Rpf B(Rv1009)、Rpf C(Rv1884c)、Rpf D(Rv2389c)、Rpf E(Rv2450c), 对于慢生长的分枝杆菌, 5 种 Rpf 蛋白均可在皮摩尔浓度下促进长期处于平稳期的细菌生长, 使低密度的受损或休眠的细菌恢复为可培养状态, 缩短细菌生长繁殖的迟滞期, 加速其生长繁殖^[10]。Rpf 能启动

Mtb 中 *Rv1776*、*Rv0238*、*mmpL* 等基因^[11],从而启动 mRNA,提高细菌的自我复苏能力,增加培养基中细菌的数量,提高 Mtb 的培养阳性率、缩短培养时间。笔者从 5 个 Rpf 中选取高效的 Rpf B 和 Rpf E^[3,12-13]组合作为复苏刺激因子,以期取得较好的效果。Rpf 一般对液体和固体培养基上的微生物均有复苏和促进作用^[14],7H11 固体培养基营养丰富,平板面积较大,利于标本的均匀涂布,且观察结果简单方便,无需通过定期测定液体培养基的 A 值判断结果,在操作过程中不易形成气溶胶而优于 7H9 液体培养基。因此,笔者在刘忠泉等^[3]摸索的 Mtb Rpf 蛋白促进脊柱结核患者脓液中 Mtb 的复苏培养最佳方案基础上,对 Rpf 复苏培养进行了一定的改进,笔者应用 7H11 固体培养基取代 7H9 液体培养基(7H11 培养基含多种抗生素,抑菌性强,解决了标本培养过程中的污染问题)。

本研究结果显示,62 例结核性胸腔积液标本中 7H11 培养基 Rpf 培养组阳性 27 例,阳性率为 43.5%;而传统改良罗氏培养组 10 例阳性,阳性率仅 16.1%;Rpf 复苏培养法较改良罗氏培养法阳性率提高了 27.4%,对 27 例复苏培养标本和 10 例改良罗氏培养标本进行 AFB、PCR 及 DNA 测序鉴定,培养菌落均证实为 Mtb,且 Rpf 培养组阳性率显著高于改良罗氏培养组($P<0.01$),提示胸腔积液中休眠或滞留的 Mtb 可在 Rpf 作用下恢复一定的生长活力,可提高胸腔积液标本 Mtb 体外培养的阳性率。

同时,本研究对高浓度和低浓度 7H11 培养基 Rpf 培养组的菌落数量进行比较,发现高、低浓度对 Mtb 具有相同的复苏和促生长作用($P>0.05$),与刘忠泉等^[3]报告相同;高、低浓度 Rpf 组可视菌落平均时间均为 20 d 左右,两组比较差异无统计学意义($P>0.05$),表明在一定浓度范围内 Rpf 对休眠 Mtb 具有相同的复苏作用。本研究 Mtb 复苏培养时间为 20 d 左右,较刘忠泉等^[3]报告关节腔积液 Mtb 培养报告的 11 d 推迟了 9 d,原因可能是液体培养基法和固体培养基法的差异,或与关节腔积液中 Mtb 浓度高于胸腔积液有关。7H11 培养基 Rpf 培养组和生理盐水对照组在阳性结果报告时间和菌落数量方面进行比较,发现 Rpf 培养组阳性结果报告时间比生理盐水对照组提前 15 d,比改良罗氏培养组提前近 20 d,7H11 培养基 Rpf 培养组与生理盐水对照组比较差异有显著统计学意义($P<0.001$);表明了 Rpf 复苏培养可显著缩短报告时间,证实了 Rpf 的促生长作用;7H11 培养基 Rpf 培养组阳性菌

落数量比生理盐水对照组多了一个数量级,两组比较差异有显著统计学意义($P<0.001$),表明了 Rpf 能使休眠或受损的 Mtb 复苏,从而提高培养阳性率。

本实验所需临床标本量大,需离心后进行液化处理,液化一定要彻底,且必须在 20 min 内完成,以免氢氧化钠损伤标本中的 Mtb 而影响培养阳性率;另外,前处理好的标本与 Rpf 蛋白需充分混匀且均匀涂布于 7H11 培养基,使培养阳性菌落分散生长以利于菌落计数。休眠菌复苏和促生长效果取决于 Mtb Rpf 蛋白的活性和纯度,因此其质量是本研究的关键,每批蛋白均需鉴定其活性、浓度及纯度。本研究系 Rpf 对胸腔积液中 Mtb 生长促进作用的初步探讨,今后拟扩大样本量,进一步验证 Rpf 对胸腔积液中 Mtb 的促进作用,技术上采用每天定期倒置显微镜下观察微小菌落并结合分子生物学鉴定,或可进一步缩短阳性结果报告时间、提高培养阳性率;如采用液体培养基进行复苏培养,是否能优于 BACTEC MGIT 960 液体培养法,进一步缩短报告时间,也是值得进一步研究的课题。

BACTEC MGIT 960 快速培养法仪器昂贵,实验所需液体培养基价格高,故很难在基层普及;改良罗氏培养法虽然价格便宜,但阳性结果报告时间长(40~60 d)而延误诊断和治疗。与上述两种方法比较,含 Rpf 的培养法具有阳性报告时间短、阳性率高的特点,方法简便安全且易于操作,不需要特殊、昂贵的仪器,价格低廉,拥有生物安全柜和 37℃ 恒温培养箱的普通实验室即可完成实验,Rpf 蛋白的制备如能商业化,将更有利于该方法的推广。因此,含 Rpf 的 Middlebrook 7H11 培养法适于在结核病高发且经济不发达的地区开展,为结核性胸膜炎的诊断增加新的证据。

参 考 文 献

- [1] Mukamolova GV, Turapov OA, Young DI, et al. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2002, 46(3): 623-635.
- [2] Zhang Y, Yang Y, Woods A, et al. Resuscitation of dormant *Mycobacterium tuberculosis* by phospholipids or specific peptides. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 284(2): 542-547.
- [3] 刘忠泉, 张宗德, 邢爱英, 等. 脊柱结核脓液中结核杆菌的复苏培养. 中国脊柱脊髓杂志, 2007, 17(9): 710-714.
- [4] 中华医学会. 临床诊疗指南 结核病分册. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 10-11.
- [5] 刘忠泉, 张宗德, 邢爱英, 等. 结核分枝杆菌复苏因子基因克隆及其蛋白质的表达. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(3): 236-237.
- [6] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程. 北京: 中国教育文化出版社, 2006.
- [7] 王志刚, 成玉妹, 叶晓艺. 187 例结核性胸膜炎胸膜结核分枝杆

- 菌药敏检测探讨. 国际呼吸杂志, 2007, 27(23): 1770-1771.
- [8] Cohen-Gonsaud M, Keep NH, Davies AP, et al. Resuscitation-promoting factors possess a lysozyme-like domain. Trends Biochem Sci, 2004, 29(1): 7-10.
- [9] Mukamolova GV, Murzin AG, Salina EG, et al. Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. Mol Microbiol, 2006, 59(1): 84-98.
- [10] Biketov S, Mukamolova GV, Potapov V, et al. Culturability of *Mycobacterium tuberculosis* cells isolated from murine macrophages: a bacterial growth factor promotes recovery. FEMS Immunol Med Microbiol, 2000, 29(4): 233-240.
- [11] 刘忠泉, 张宗德, 邢爱英, 等. 结核分枝杆菌休眠复苏期与活跃期的差异表达基因分析. 中华结核和呼吸杂志, 2008, 31(6): 442-447.
- [12] Wu X, Yang Y, Han Y, et al. Effect of recombinant Rv1009 protein on promoting the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. J Appl Microbiol, 2008, 105(4): 1121-1127.
- [13] Kana BD, Gordhan BG, Downing KJ, et al. The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth *in vitro*. Mol Microbiol, 2008, 67(3): 672-684.
- [14] Mukamolova GV, Turapov OA, Young DI, et al. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2002, 46(3): 623-635.

(收稿日期: 2014-01-13)

(本文编辑: 张晓进)

· 征文通知 ·

第二届骨关节结核临床诊断与治疗进展及其规范化专题研讨会征文

《中国防痨杂志》和《结核病与肺部健康杂志》编委会(以下简称“两刊编委会”)主办的首届“骨关节结核临床诊断与治疗进展及其规范化专题研讨会”召开以来, 相关领域发生了深刻的变化, 新理念、新思维、新技术应用不断涌现。为此, 由中国防痨协会临床专业委员会外科学组、两刊编委会、首都医科大学附属北京胸科医院主办, 山东省胸科医院、上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心、大连市结核病医院协办的“第二届骨关节结核临床诊断与治疗进展及其规范化专题研讨会”将于 2014 年 6 月 12—15 日在大连市召开。

本次会议经过充分协商, 组成了具有广泛代表性 & 权威性的学术委员会与组织工作委员会(简称“两委会”; 专家排序不分先后)。

大会名誉主席: 许绍发、肖和平、张志勇、刘志敏、马远征、谭守勇。大会主席: 秦世炳、宋言峥、金锋。大会学术委员会委员: 肖和平、唐神结、张忠顺、王琳、刘新、陈裕、陈根旺、阚晓宏、陈晓红、崔文玉、党丽云、邓群益、谭守勇、杜娟、雷建平、许绍发、金锋、宋言峥、刘志敏、王自立、马远征、赵必增、薛海滨、宋滇文、秦世炳、张志勇、王培军、施裕新、路希维、高斌、周新华、张国龙、卢旭华、蒋垚、魏建华、董秀兰、冯秀岭、钱南平、李斌、李亮、吴晓明、张强、钮晓红、杨瑞、徐凯进、张勇、李宏军、曹烨、徐双铮、李亮、雷国华、柳盛春、罗坚、陈其亮、地里夏提、刘宗兴、杨枢敏、陈其亮、古蕾丁、郭皖营、黄雁鸣、蒋韶宁、赵明伟、赵涛、王传庆、罗坚、魏国富、肖经难、赵久顺、张祥英、董伟杰、施力、浦育、罗福壮、高海军、戴希勇、王成、刘丰胜、买尔丹、施建党、张忠民、郑绪鹏。

大会组织工作委员会主任委员: 路希维。大会组织工作委员会委员: 杨连军、曹淑霞、朱爱军、兰汀隆、范俊。

大会秘书: 柳盛春、董伟杰。

大会讲座初步安排如下: (1) 唐神结: 结核病的化疗进展; (2) 赵雁林: 结核病的实验室诊断新技术; (3) 宋言峥: 经典骨关节结核病灶清除术; (4) 董伟杰: 关节结核的临床诊断和鉴别诊断; (5) 张宏其: 脊柱结核手术内固定方式的选择; (6) 许建中: 西南地区骨结核治疗经验; (7) 薛海滨: 微创技术在骨关节结核中的应用及前景预测; (8) 地里夏提: 新疆骨结核手术治疗经验总结; (9) 周新华: 骨关节结核的影像学诊断; (10) 谭守勇: 结核病化疗不良反应及应对策略; (11) 秦世炳: 北京胸科医院近 10 年骨关节结核诊治现状与进展; (12) 罗坚: 老年脊柱结核的诊断与治疗; (13) 金锋: 脊柱结核的保守治疗; (14) 柳盛春: 脊柱结核致截瘫的手术探讨; (15) 张强: 耐药脊柱结核的诊断与治疗。

本届研讨会将致力于三大目标: 创建成立“中国防痨协

会临床专业委员会骨科学组”; 骨、关节结核手术治疗新技术及临床应用探讨, 在充分讨论的基础上, 就优化诊断与治疗程序、如何实施个性化术式及手术路径达成专家共识提出意见和建议; 使得本专题研讨会成为定期召开的学术交流平台, 努力成为本专业的品牌学术会议。

与会者将获得国家级 I 类医学继续教育学分证书。

希望广大专家关注 & 参与此次具有实用与指导意义的大会, 现在开始征文。

一、征文内容

凡是公开发行的下述论文均在征文之列: (1) 骨关节结核的临床诊治。包括大宗病例诊治报告、术式探讨与改进、方法学探讨与改进、诊治流程的规范化与标准, 等等。(2) 与骨关节结核相关的、对临床有指导意义的影像学诊断、实验室诊断, 包括各类对临床有实用价值的影像学分型、诊断流程的优化、确定诊断的依据, 等等。(3) 与会议主题相关的讲座、综述、专论、对于已有的骨关节结核外科术式、方法的深入解读等内容。(4) 与结核病活动性相关的生物标志物检测。同时也欢迎脊柱结核非手术疗法的论文投稿。

二、征文须知

1. 征文撰写要求与投稿: 参考近期《中国防痨杂志》刊出论著的段落结构格式撰写稿件, 需附 400 字左右的中文摘要, 全文字数最好控制在 5000 字以内。Word 文档格式的稿件请 Email 至中国防痨杂志编辑部张晓进(电子邮箱: zhangwuke1976@163.com) 或郭萌(电子邮箱: guomengggg@sina.com); 同时, 将单位介绍信寄至: 100035 北京市西城区东光胡同 5 号《中国防痨杂志》编辑部 张晓进收, 信封上注明“骨关节结核征文介绍信”。

2. 征文录用: 大会学术委员会将组织专家审阅稿件, 通过的征文将纳入会议汇编, 优秀论文将推荐给《中国防痨杂志》或《结核病与肺部健康杂志》刊出。

3. 征文截止日期: 2014 年 5 月 10 日。

三、会议具体时间地点与参加人员

征文结束时, 将给征文论文的作者寄上会议正式通知。同时也欢迎不准备撰写论文但是关注此次会议的专业工作者参加会议, 现在起可以通过上述联系人 & 联系邮箱报名, 届时也将寄上会议正式通知。

大会两委会热烈欢迎结核界 & 骨关节相关学科代表投稿并参加会议, 届时将安排专家 & 与会者充分的时间进行面对面的深入讨论, 期望我们在美丽的海滨城市大连相见!

两刊编委会