

## KPC-2 基因在克雷伯菌属中传播机制研究\*

巫丽娟, 王婷婷, 何青晏, 赵丹, 唐思诗, 康梅, 何超, 谢轶<sup>△</sup>

四川大学华西医院 实验医学科(成都 610041)

**【摘要】** 目的 研究克雷伯菌属对亚胺培南耐药机制以及 KPC-2 基因在克雷伯菌属中传播机制。方法 收集四川大学华西医院两个阶段(2009~2010 年和 2012~2013 年)分离的对亚胺培南耐药的克雷伯菌属细菌。琼脂稀释法测定亚胺培南最低抑菌浓度(MIC), CARB ChromID 平板和改良 Hodge 试验检测碳青霉烯类耐药表型, PCR 检测细菌的 KPC-2 基因表达。质粒接合试验检测质粒传播性。随机引物扩增多态性 DNA(RAPD)方法和肠杆菌基因间重复一致序列聚合酶链反应(ERIC-PCR)技术分别用于分析质粒和菌株的同源性。结果 第一阶段筛选并确证耐亚胺培南的 3 株产酸克雷伯菌首先获得碳青霉烯类抗生素耐药性, 第二阶段筛选并确证耐亚胺培南的 7 株肺炎克雷伯菌出现相同的获得性耐药。PCR 显示 10 株细菌均携带 KPC-2 型基因。质粒接合试验显示产酸克雷伯菌中携带 KPC-2 基因的质粒可以传递到受体菌, 且与 KPC-2 基因阳性的肺炎克雷伯菌中携带的质粒具有同源性。ERIC-PCR 结果显示 7 株 KPC-2 基因阳性的肺炎克雷伯菌具有同源性。结论 四川大学华西医院分离的对亚胺培南耐药的肺炎克雷伯菌和产酸克雷伯菌主要耐药机制是产生 KPC-2 型碳青霉烯酶。产酸克雷伯菌中携带 KPC-2 基因质粒, 该质粒具有传递性且与肺炎克雷伯菌携带质粒相同。肺炎克雷伯菌中耐药株的传播形式为同一克隆传播, 而在克雷伯菌属中不同菌种间耐药传播途径为同一质粒的水平传播。

**【关键词】** 肺炎克雷伯菌 产酸克雷伯菌 亚胺培南 KPC 质粒

**The Transmission of KPC-2 Gene in Klebsiella Species** WU Li-juan, WANG Ting-ting, HE Qing-yan, ZHAO Dan, TANG Si-shi, KANG Mei, HE Chao, XIE Yi<sup>△</sup>. Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

<sup>△</sup> Corresponding author, E-mail: xie\_yi77@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the mechanisms of imipenem resistance in *Klebsiella spp.* and the transmission of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2 (KPC - 2) gene in *Klebsiella* species. **Methods** The imipenem resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* were isolated in the West China Hospital of Sichuan University in 2009/2010 and 2012/2013. Their minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by agar dilution method. CARB ChromID plate and improved Hodge test were undertaken to detect carbapenemases resistant phenotype. PCR method was used for detecting KPC-2 gene. Plasmid transmission was detected by plasmid conjugation tests. The homology of the plasmids and the strains was analyzed using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR(ERIC-PCR) methods. **Results** Three strains of *Klebsiella oxytoca* collected in 2009/2010 and 7 *Klebsiella pneumoniae* collected in 2012/2013 developed carbapenemases resistance, all of which carried KPC-2 gene. The 3 KPC-2 positive plasmids isolated from *Klebsiella oxytoca* transited to recipient organisms and showed homology with the 7 KPC-2 gene positive plasmids isolated from *Klebsiella pneumoniae*. The ERIC-PCR showed homology of the 7 KPC positive *Klebsiella pneumoniae*. **Conclusion** Carbapenemases in *Klebsiella spp.* with expressed KPC-2 gene contribute to the development of resistance in this hospital. The transmission of KPC-2 plasmid in *Klebsiella oxytoca* may cause imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*. The horizontal transmission may be the main mechanism in the spread of imipenem resistance in *Klebsiella spp.*

**【Key words】** *Klebsiella pneumoniae* *Klebsiella oxytoca* Imipenem KPC Plasmid

近年来由于碳青霉烯类抗生素的大量使用造成克雷伯菌属细菌产生严重耐药性。新的耐药基因和

基因亚型在克雷伯菌中被发现, 如 KPC-2 (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2)、NDM-1 (New Delhi metallo-beta-lactamase-1) 等<sup>[1-3]</sup>。KPC 型碳青霉烯酶属于 Ambler 分类的 A 类<sup>[4-5]</sup>, 可水解除头霉素类以外的几乎所有  $\beta$ -内酰胺类抗生

\* 国家自然科学基金(No. 81000712)资助

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: xie\_yi\_77@163.com

素<sup>[6]</sup>,常常引起革兰阴性杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药。因此,KPC 基因被认为是引起克雷伯菌属对碳青霉烯类抗生素耐药的主要原因<sup>[7-8]</sup>。耐药基因可通过质粒、转座子等移动元件在克雷伯菌及其它细菌中广泛传播<sup>[9]</sup>。然而,目前 KPC 基因在克雷伯菌属中的传播机制尚不清楚,该基因在医院环境中的传播机制也缺乏解释。本研究分阶段对四川大学华西医院 2009~2013 年分离的对亚胺培南耐药的克雷伯菌进行研究,解释 KPC 基因传播机制以及耐药质粒、耐药菌株的同源性,为临床控制 KPC 基因和相关耐药菌株的传播提供有意义的的数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株来源

收集四川大学华西医院临床分离的耐亚胺培南的克雷伯菌属菌株,本实验将其分为两个阶段:2009 年 6 月至 2010 年 6 月为第一阶段,2012 年 6 月至 2013 年 6 月为第二阶段。目的是为了比较 2009 年

6 月至 2010 年 6 月从产酸克雷伯菌中筛选出来的产 KPC 菌株与 2012 年 6 月至 2013 年 6 月(两年后)在肺炎克雷伯菌中筛选出来的产 KPC 菌株有何关系。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC25922,肺炎克雷伯菌 ATCC700603。大肠埃希菌 J53 作为接合实验受体菌。

### 1.2 主要试剂及仪器

亚胺培南/西司他丁(500 mg/500 mg)1:1 (Impenem):杭州默沙东制药有限公司,效价 50%。质粒提取试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)。KPC-2 基因、肠杆菌基因间重复一致序列聚合酶链反应(ERIC-PCR)引物以及随机引物扩增多态性 DNA(RAPD)见表 1。

克雷伯菌属细菌经 VITEK2 Compact 全自动微生物鉴定药敏系统(生物梅里埃,法国)鉴定至种,必要时加入手工生化鉴定。引物根据 KPC-2 基因自行设计,最终产物测序,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 PCR 引物

Table 1 PCR primers

Primer name	Sequence (5'-3')	Amplification purpose	Expected product
KPC-2	F:GGCTCAGGCGCAACTGTAAGT	KPC gene amplification detection	About 300 bp
	R:CGGCGGCGTTATCACTGTATT		
ERIC	F:ATGTAAGCTCCTG GGGATTAC	Strains of typing	About 500-700 bp
	R:AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		
Random primer	AAGAGGGCGT	Plasmid typing	About 300 bp

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 碳青霉烯类抗生素耐药表型筛选和确证

CARB ChromID 平板(生物梅里埃,法国)和改良的 Hodge 实验<sup>[10]</sup>用于碳青霉烯类抗生素耐药表型筛选。琼脂稀释法用于测定克雷伯菌株亚胺培南敏感性,最低抑菌浓度(MIC)>1 μg/mL 判断为亚胺培南耐药<sup>[10]</sup>。

**1.3.2 PCR 检测 KPC-2 基因** 煮沸裂解法提取细菌 DNA 作为 PCR 模板进行 KPC-2 基因扩增。PCR 体系(25 μL): ddH<sub>2</sub>O,9.5 μL;PCR Mixture,12.5 μL;引物,2 μL;模板,1 μL。反应条件:95 °C 1 min,95 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 30 s,30 个循环,72 °C 延伸 8 min。20 g/L 琼脂糖电泳检测产物并送 invitrogen 公司做测序和 BLAST 分析,与 GenBank 上源自肺炎克雷伯菌株 HZ001 的 KPC-2 (GU086225)进行同源性比对。

**1.3.3 质粒提取及接合试验** 质粒提取实验按照质粒提取试剂盒说明书进行。分别以 3 株耐亚胺培南的产酸克雷伯菌为供体菌,以 *E. coli* J53 为受体

菌,进行混合培养。由于临床微生物常用厄他培南药敏试验指示亚胺培南耐药,因此本实验选用厄他培南平板进行药敏试验,取 0.1 mL 混合液涂抹于含 150 mg/L 叠氮钠和 2 mg/L 厄他培南平板。35 °C 孵育过夜后筛选接合子,鉴定菌种并以 PCR 方法检测目的基因。

**1.3.4 质粒同源性分析** 对携带 KPC-2 型碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌和产酸克雷伯菌提取的质粒以 RAPD 方法分析质粒的同源性。RAPD-PCR 体系(25 μL):ddH<sub>2</sub>O,8.5 μL;PCR Mixture,12.5 μL;引物,2 μL;模板,2 μL。RAPD-PCR 反应条件:94 °C 5 min;94 °C 45 s,38 °C 45 s,65 °C 2 min,35 个循环;72 °C 7 min。20 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析质粒同源性。

**1.3.5 菌株同源性分析** 采用 ERIC-PCR 方法对 7 株产 KPC-2 型碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌进行扩增反应,ERIC-PCR 体系(25 μL): ddH<sub>2</sub>O,9.5 μL;PCR Mixture,12.5 μL;引物,2 μL;模板,1 μL。ERIC-PCR 反应条件:94 °C 7 min;94 °C

1 min, 42 °C 1 min, 68 °C 8 min, 30 个循环; 68 °C 16 min。20 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析菌株同源性。

## 2 结果

### 2.1 克雷伯菌属对亚胺培南耐药情况

克雷伯菌属在 2009 年到 2013 年期间对亚胺培南的耐药情况均很低, 均  $\leq 2.5\%$  (表 2)。

本研究第一阶段(2009 年 6 月至 2010 年 6 月)中, 经表型筛选和确证实验筛选出 3 株亚胺培南耐药的产酸克雷伯菌, 未筛选出肺炎克雷伯菌。第二阶段(2012 年 6 月至 2013 年 6 月), 经表型筛选和

确证实验筛选出 7 株亚胺培南耐药的肺炎克雷伯菌, 未筛选出产酸克雷伯菌(表 3)。

### 2.2 克雷伯菌株 KPC-2 基因筛查

见图 1。3 株产酸克雷伯菌和 7 株肺炎克雷伯菌经过 PCR 筛查和 BLAST 比对与 GenBank 上源自肺炎克雷伯菌株 HZ001 的 KPC-2(GU086225) 同源性为 99%~100%, 确定筛选菌株均携带 KPC-2 型基因。

### 2.3 质粒提取和接合试验

提取 3 株产酸克雷伯菌和 7 株肺炎克雷伯菌中携带的质粒, 电泳显示其质粒大小一致(图 2)。

表 2 克雷伯菌属对亚胺培南的整体耐药情况

Table 2 Imipenem resistance in *Klebsiella* species

Imipenem resistance	2009	2010	2011	2012	2013
Resistance rate to imipenem/%	1.9	2.4	1.2	2.5	2.1
Total number of strains/strain	1 276	1 490	1 394	1 700	1 902
Imipenem resistant strains/strain	24	36	17	43	40

表 3 克雷伯菌对亚胺培南耐药性筛选与确证结果

Table 3 Imipenem resistance to in *Klebsiella* bacteria

Strain No.	Strain type	VITEK2 Compact detection, MIC result/(mg/L)	CARB ChromID screen	Improved Hodge experiment	AGAR dilution method, MIC result(mg/L) and explanation
I-8	KOX	8	/	+	8 (R)
I-9	KOX	8	/	+	8 (R)
I-10	KOX	$\geq 16$	/	+	8 (R)
II-1	KPN	8	+	+	4 (R)
II-2	KPN	8	+	+	8 (R)
II-3	KPN	$\geq 16$	+	+	8 (R)
II-4	KPN	8	+	+	8 (R)
II-5	KPN	8	+	+	4 (R)
II-6	KPN	$\geq 16$	+	+	128 (R)
II-7	KPN	8	+	+	4 (R)
	ATCC 25922 ( <i>E. coli.</i> )	$\leq 1$	-	-	0.5 (S)
	ATCC700603 (KPN)	$\leq 1$	-	-	0.5 (S)

KOX: *Klebsiella oxytoca*; KPN: *Klebsiella pneumoniae*; R: Resistance; S: Sensitive

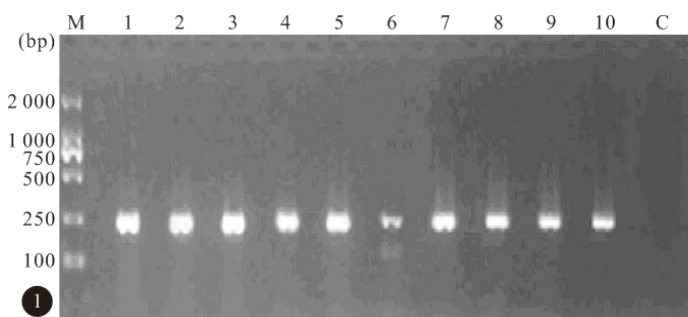


图 1 耐亚胺培南肺炎克雷伯菌和产酸克雷伯菌 KPC-2 基因检测结果电泳图

Fig 1 KPC-2 gene test results of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*

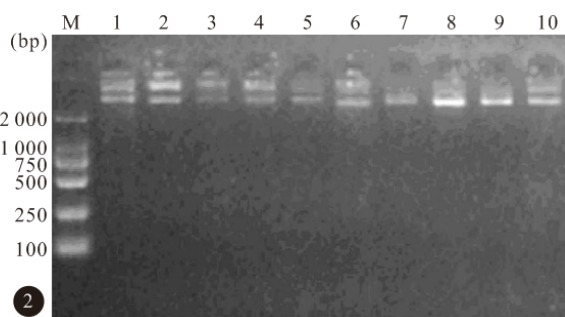


图 2 耐亚胺培南肺炎克雷伯菌和产酸克雷伯菌质粒提取产物电泳图

Fig 2 The electrophoresis figure of

plasmid extraction product of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*

M: DNA marker DL2000; 1-7: 7 strains resistant to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*; 8-10: 3 strains resistant to imipenem in *Klebsiella oxytoca*; C: *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603

本实验第一阶段筛选出亚胺培南耐药的产酸克雷伯菌 3 株,经质粒接合试验显示,受体菌 J53 经接合获得 KPC-2 基因,接合子鉴定率 97.9%,即该菌为大肠埃希 J53 的符合率为 97.9%。

#### 2.4 携带 KPC-2 基因的质粒同源性分析

经过 RAPD 方法对肺炎克雷伯和产酸克雷伯菌提取的携带 KPC-2 基因的质粒进行分型,产物大小相同,故证明两种菌来源的质粒相同,即对亚胺培南耐药的产酸克雷伯菌和肺炎克雷伯菌中携带的质粒具有同源性(图 3)。

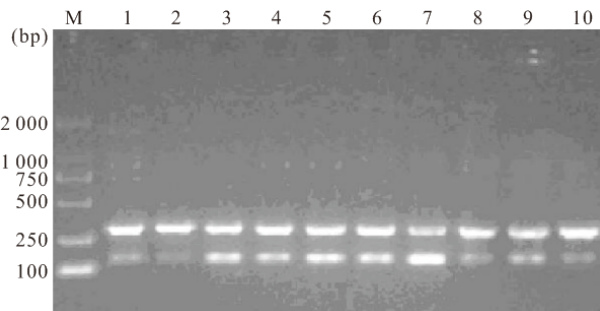


图 3 耐亚胺培南肺炎克雷伯菌和产酸克雷伯菌携带质粒的 RAPD 分析

Fig 3 RAPD of plasmid of imipenem resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*

M: DNA marker DL2000; 1-7: 7 strains resistant to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*; 8-10: 3 strains resistant to imipenem in *Klebsiella oxytoca*

#### 2.5 亚胺培南耐药的肺炎克雷伯菌同源性分析

对照组肺炎克雷伯菌标准株 ATCC700603 的条带显示 ERIC-PCR 能够区分对照株和研究株。ERIC-PCR 分型结果显示,7 株亚胺培南耐药的肺炎克雷伯菌属都在 500 bp 和 750 bp 位置显影,属于同一克隆株(图 4)。

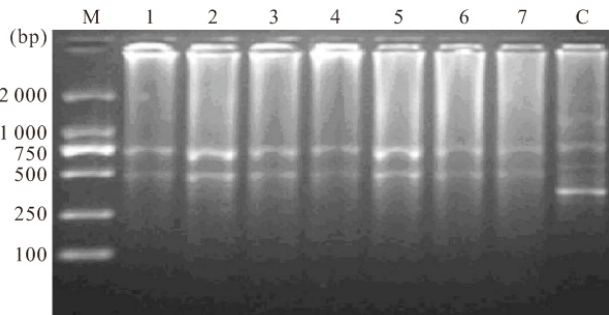


图 4 耐亚胺培南肺炎克雷伯菌 ERIC-PCR 分型分析菌株同源性

Fig 4 The ERIC-PCR classification analysis strain homology of imipenem resistance to in *Klebsiella pneumoniae*

M: DNA marker DL2000; 1-7: 7 strains resistant to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*; C: *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603

### 3 讨论

自 2001 年美国<sup>[11]</sup>首次报道第一株产 KPC 型碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌后,该菌在全球范围快速播散,且在世界各地多个医院出现院内爆发流行。KPC 类碳青霉烯酶几乎对所有  $\beta$ -内酰胺类抗生素显示耐药性,目前共发现 8 个亚型(KPC2-9)<sup>[12-14]</sup>,其中 KPC-2 型碳青霉烯酶最为常见。产 KPC 酶肠杆菌科细菌的出现和快速播散给临床治疗带来严重威胁<sup>[15-16]</sup>,已成为全球性的公共卫生问题。2007 年浙江省报道了我国第一例产 KPC-2 酶的肺炎克雷伯菌<sup>[8]</sup>,随后在全国多个地方又有报道<sup>[17-18]</sup>。细菌借助于可移动遗传元件(整合子、转座子、插入序列和质粒等)获取获得性耐药基因是细菌的两类主要耐药机制之一(而另一类为突变耐药)<sup>[19]</sup>,获得性耐药基因既能垂直传播又可水平播散,水平播散甚至能传给不同种的细菌<sup>[20-21]</sup>。国外有研究显示,KPC-2 编码基因位于可结合质粒的转座子 Tn4401 上<sup>[9]</sup>,可以通过转座作用造成细菌耐药性的扩散。

本实验按时间阶段收集对亚胺培南耐药的克雷伯菌,发现第一阶段产酸克雷伯菌首先获得碳青霉烯类抗生素耐药性,第二阶段肺炎克雷伯菌出现相同的获得性耐药,因此本研究从表型筛选到基因分型对克雷伯菌属碳青霉烯类抗生素耐药机制和耐药机制的传播进行探讨。表型筛选结果提示,仪器法(VITEK2)亚胺培南 MIC 结果、CARB ChromID 平板以及改良的 Hodge 试验<sup>[10]</sup>均可用于筛选产碳青霉烯酶菌株,与表型确证实验——琼脂稀释法 MIC 结果比较,筛选方法一致性较好,结果可相互印证。质粒接合试验和质粒分型结果提示产酸克雷伯菌可能将 blaKPC 质粒传递给肺炎克雷伯菌,引起肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素耐药。因此,由质粒介导的 KPC-2 型碳青霉烯酶基因在克雷伯菌属中传播途径为同一质粒的水平传播,具有引起耐药基因扩散风险。ERIC-PCR 技术对 7 株耐亚胺培南的肺炎克雷伯菌进行同源性分析显示目标菌具有高度同源性,提示本研究中耐亚胺培南的肺炎克雷伯菌以同一克隆的形式在医院内传播,具有引起院内感染爆发流行的风险。本研究对 KPC 阳性菌株进行筛选,动态显示 KPC 质粒在克雷伯菌中的传播途径,为临床控制 KPC 阳性菌株和相关耐药基因的传播途径提供参考。

第一阶段产酸克雷伯菌首先获得碳青霉烯类抗生素耐药性,第二阶段肺炎克雷伯菌出现相同的获

得性耐药,质粒接合试验和质粒分型结果提示产酸克雷伯菌可能将 blaKPC 质粒传递给肺炎克雷伯菌,克雷伯菌属中不同菌种间耐药传播途径为同一质粒的水平传播。因此四川大学华西医院分离的对亚胺培南耐药的肺炎克雷伯菌和产酸克雷伯菌主要耐药机制是产生 KPC-2 型碳青霉烯酶。产酸克雷伯菌中携带 KPC 基因质粒,该质粒具有传递性且与肺炎克雷伯菌携带质粒相同。ERIC-PCR 技术对耐亚胺培南的肺炎克雷伯菌进行同源性分析显示目标菌具有高度同源性,提示肺炎克雷伯菌中耐药株的传播形式为同一克隆传播。

### 参 考 文 献

- [1] NORDMANN P, BOULANGER AE, POIREL L. NDM-4 metallo- $\beta$ -lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(4):2184-2186.
- [2] CHEN Y, ZHOU Z, JIANG Y, et al. Emergence of NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* in China. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(10):1255-1259.
- [3] HOMSEY M, PHEE L, Wareham DW. A novel variant (NDM-5) of the New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) in a multidrug resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(12):5952-5954.
- [4] QUEENAN AM, BUSH K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3):440-458.
- [5] MIRIAGO V, COMAGLIA G, EDELSTEIN M, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens; detection and surveillance issues. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(2):112-122.
- [6] LABOMBARDI VJ. The emergence of the KPC carbapenemases; clinical and laboratory issues. Reviews in Medical Microbiology, 2007, 18(2):29-34.
- [7] MIRIAGO V, TZOUVELEKIS LS, ROSSITER S, et al. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(4):1297-1300.
- [8] NORDMANN P, CUZON G, NAAS T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis, 2009, 9(4):228-236.
- [9] KAASE M, NORDMANN P, WICHELHAUS TA, et al. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(3):1260-1262.
- [10] Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing. Nineteenth Informational Supplement. CLSI documents M100-S22. Chicago:CLSI, 2012.
- [11] YIGIT H, QUEENAN AM, ANDERSON GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing P-lactamases, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(4):1151-1161.
- [12] BACHELLIER S, CLEMENT JM. Short palindromic repetitive DNA elements in enterobacteria: a survey. Res Microbiol, 1999, 150(9/10):627-639.
- [13] VERSALOVIC J, KOEUTH T, LUPSKI JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finger printing of bacterial genomes. Nucleic Acids Res, 1991, 19(24):6823-6831.
- [14] DALLA-COSTA LM, ITINO K, RODRIGUES J, et al. Characterisation of diarrhoeagenic *Escherichia coli* clones by ribotyping and ERIC-PCR. J Med Microbiol, 1998, 47(3):227-234.
- [15] 万梅玲, 杨青. 553 株亚胺培南病原菌分布与耐药分析. 抗感染药学, 2010, 7(1):48-50.
- [16] 林国聪. 产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌研究进展. 中国医学创新, 2012, 9(22):159-161.
- [17] 冯雅君, 沈萍, 杜小幸. 产碳青霉烯酶 KPC-2 肺炎克雷伯菌局部流行. 浙江医学, 2008, 30(9):923-925.
- [18] 黄支密, 糜家睿, 盛以泉. 携带 blaKPC-2 型碳青霉烯酶基因泛耐药肺炎克雷伯菌医院内感爆发的病原学分析. 中华流行病学杂志, 2010, 31(5):559-562.
- [19] 王春新, 耿先龙, 许亚丰, 等. 泛耐药鲍曼不动杆菌获得性耐药相关基因与可移动遗传元件检测的指标聚类分析. 南京医科大学学报(自然科学版), 2012, 32(1):115-118.
- [20] 翁幸璧, 糜祖煌, 金辉. 多耐药大肠埃希菌获得性耐药基因检测及指标聚类分析. 中华临床感染病杂志, 2011, 4(3):154-158.
- [21] 王卫华, 陈洁, 毛雄英, 等. 泛耐药鲍曼不动杆菌获得性耐药基因和可移动遗传元件检测与指标聚类分析. 中华临床感染病杂志, 2012, 5(1):9-14.

(2015-09-17 收稿, 2016-01-12 修回)

编辑 吕熙