

• 论 著 •

耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的耐药分子学研究^{*}

张晓慧,王瑞雪,高春艳,侯辰蕊,宋 静,戎建荣[△]

(山西医学科学院·山西白求恩医院检验科,山西太原 030032)

摘 要:**目的** 研究该院临床分离的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的耐药分子学机制。**方法** 分析该院临床微生物实验室分离的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌株(CRKP),采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)和全自动微生物分析仪(VITEK-2 compact)鉴定细菌并进行药物敏感试验分析,采用改良 Hodge 试验(MHT)和碳青霉烯酶灭活试验(CIM)进行表型确证;聚合酶链式反应(PCR)法检测碳青霉烯酶基因型,并进行基因测序 BLAST 比对和多位点序列分析(MLST)。**结果** 46 株耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌对常用抗菌药物均表现出高耐药性;耐碳青霉烯表型确证均呈阳性,PCR 检测结果显示其中包括 A 类碳青霉烯酶(KPC-2 型)和 B 类金属酶(NDM-1 和 IMP-4),MLST 分型以 ST11 型为主。**结论** 该院分离的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的耐药分子学机制主要以产 KPC-2 型碳青霉烯酶的 ST11 型为主,同时有少量其他型别的检出,加强院内感染监测强度和力度,以及进一步规范抗菌药的合理使用显得尤为重要。

关键词:耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌; 基因测序; 多位点序列分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.11.018

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2020)11-1357-05

文献标识码:A

Molecular study of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* resistance^{*}

ZHANG Xiaohui, WANG Ruixue, GAO Chunyan, HOU Chenrui, SONG Jing, RONG Jianrong[△]

(Department of Clinical Laboratory, Shanxi Academy of Medical Sciences,

Shanxi Baiqiuen Hospital, Taiyuan, Shanxi 030032, China)

Abstract:**Objective** To study the molecular mechanism of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinically isolated in this hospital. **Methods** The carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) isolated from the clinical microbiology laboratory of our hospital was analyzed. The bacteria were identified by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and full-automatic microbial analyzer (Vitek-2 compact) and drug sensitivity test was carried out, phenotype was confirmed by modified Hodge test (MHT) and carbapenem inactivation test (CIM). Carbapenem genotypes were detected by polymerase chain reaction (PCR), and gene sequencing blast comparison and multi site sequence analysis (MLST) were carried out. **Results** A total of 46 strains of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* showed high resistance to common antibiotics, and carbapenem resistant phenotypes were confirmed to be positive. PCR detection results showed that the carbapenem A (KPC-2 type) and B-type metal enzymes (NDM-1 and IMP-4) were included, and the MLST type was mainly ST11 type. **Conclusion** The molecular mechanism of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated in our hospital is mainly ST11, which produces KPC-2 carbapenem, and a small number of other types are detected. It is particularly important to strengthen the intensity and intensity of hospital surveillance and further regulate the rational use of antibiotics.

Key words: carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*; gene sequencing; multi site sequence analysis

碳青霉烯类抗菌药是治疗多重耐药肠杆菌科细菌(产 ESBLs 和/或产 AmpC 酶)导致的严重感染的选择药物^[1]。但随着碳青霉烯类抗菌药的大量使用,耐碳青霉烯肠杆菌科细菌出现并逐渐增多,其中主要

是耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌(CRKP),严重威胁人类健康,给临床治疗重症感染带来严峻挑战,也是当前研究的热点。本研究对分离自本院的 CRKP 菌株进行了碳青霉烯酶的表型确证和产酶基因型(A、B、D

^{*} 基金项目:山西省自然科学基金项目(201601D011116)。

作者简介:张晓慧,女,主管技师,主要从事临床微生物方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: zhangzihan_2008012@163.com。

本文引用格式:张晓慧,王瑞雪,高春艳,等.耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的耐药分子学研究[J].国际检验医学杂志,2020,41(11):1357-

类)的聚合酶链反应(PCR)扩增,并进行多位点序列分型(MLST),对本院的 CRKP 流行特征和耐药分子机制进行研究,为感染防控提供分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 从本院临床微生物实验室的感染患者标本中分离到 1 906 株肺炎克雷伯菌,筛选出 CRKP 46 株(2.40%)。质控菌株包括:大肠埃希菌 ATCC25922,肺炎克雷伯菌 ATCC700603,肺炎克雷伯菌 ATCC BAA 1705,肺炎克雷伯菌 ATCC BAA 1706。

1.2 仪器与试剂 主要仪器:Vitek-2 compact(法国 Bio Merieux),MALDI-TOF MS 质谱仪(美国 Bruker, Microflex LT/SH),PCR 扩增仪(Eppendorf),电泳仪(北京君意, JY300C),凝胶成像仪(Alphamager HP, Protein simple);试剂:血平板(郑州安图),MH 水解酪蛋白平板(天津金章),引物等基因扩增试剂盒(赛默飞世尔科技中国有限公司),亚胺培南和美罗培南纸片(Oxoid 公司),DNA 测序(上海生物工程公司)。

1.3 方法

1.3.1 菌种鉴定及药敏试验分析 根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)解释分类标准,当亚胺培南或美罗培南 MIC 为 2.0~4.0 $\mu\text{g/mL}$ 或厄他培南 MIC 为 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,怀疑肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶,需要作验证试验确证。因此,本研究采用亚胺培南 MIC 值 $\geq 2.0 \mu\text{g/mL}$ 作为指标筛选 CRKP 菌株以免漏检低耐药株,同时检测美罗培南和厄他培南的 MIC。将待检菌株血平板传代后 35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 18~24 h,采用 MALDI-TOF-MS 进行菌株鉴定,药敏试验采用 MIC 法(VITEK-2 compact),纸片扩散(K-B)法复核,筛选出 46 株亚胺培南 MIC $\geq 2.0 \mu\text{g/mL}$ 的肺炎克雷伯菌株。

1.3.2 表型确证试验

1.3.2.1 改良 Hodge 试验(MHT)^[2,14] 参照 2017 年 CLSI 解释分类标准,将 0.5 麦氏单位的大肠埃希菌(ATCC25922)菌液 1:10 稀释后,均匀密涂在 MH 平皿上,中心贴美罗培南纸片,将待测菌株、阴性、阳性对照分别以中心美罗培南纸片为起点,沿半径方向离心划线,35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,对碳青霉烯抗菌药敏感的大肠埃希菌 ATCC25922 沿接种线条向含有碳青霉烯类抗菌药纸片的方向生长即判断为阳性。阳性对照(肺炎克雷伯菌 ATCCBAA1705),阴性对照(肺炎克雷伯菌 ATCCBAA1706)。

1.3.2.2 碳青霉烯酶灭活试验^[2](CIM) 参照 CLSI 标准,用接种环从孵育过夜的血平板上挑取一环待测菌落,溶于 E_p 管的生理盐水中,漩涡振荡混匀菌悬液,用无菌镊子将美罗培南(10.0 μg)纸片浸入已混匀的菌悬液中(待测菌株、阳性对照、阴性对照),再次漩涡混匀,置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h 后取出,立即贴于已经均匀密涂 0.5 麦氏单位的大肠埃希菌(ATCC25922)

的 MH 平板上,再次置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 温箱,孵育 18~24 h 后观察结果。阴阳性对照菌株同改良 Hodge 试验。

1.4 耐药基因检测

1.4.1 PCR 模板的制备 将 46 株实验菌株纯培养物,挑取一定量的新鲜菌落(18~24 h 内)悬浊混匀于 300.0 μL 的去离子水中,沸水浴 15 min 后,12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液作为模板,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。引物稀释前先 12 000 r/min 离心 5 min 后,加入等体积的去离子水,漩涡振荡器混匀,作为储存液。

1.4.2 基因检测 7 对反应引物^[3]和 PCR 扩增条件参照本课题前期研究^[14]见表 1;总反应体系 25.0 μL , 2 $\times$ Mix 12.5 μL ,引物 1.0 μL ,模板 1.0 μL ,dd 水 9.5 μL ;KPC、IMP、SME、GES、VIM、OXA48-L 基因的反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;进入循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s/50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min (IMP),72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,30 个循环后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min;NDM 基因的反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;进入循环:95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,57.5 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,25 个循环后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min;扩增产物采用 1.50%琼脂糖凝胶电泳并成像记录结果。

1.5 多位点序列分析(MLST) 所有 CRKP 菌株进行 MLST 分析,参照 MLST 专业网站^[15](<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>)对 7 个管家基因 gapA、infB、mdh、pgi、rpoB、pheE 和 tonB 进行 PCR 和测序。引物及反应条件参照巴斯德数据库(<http://bigsd.b. web. pasteur. fr>)。测序结果在肺炎克雷伯菌 MLST 数据库([http://pubmlst.org/Klebsiella pneumoniae/](http://pubmlst.org/Klebsiella_pneumoniae/))中进行 BLAST 比对,确定其菌株 ST 型别。

2 结果

2.1 菌种鉴定及药敏试验

2.1.1 菌种鉴定 历时两年收集本院临床分离到肺炎克雷伯菌株 1 906 株,筛选出 CRKP 50 株,鉴定药敏复核后,剔除敏感菌株 4 株,得到 46 株 CRKP (2.40%),标本主要类型为痰液(41.30%)、尿液(19.50%)、腹水(8.70%)、引流液(4.30%)、血液(2.00%)和其他(24.20%);主要来源是重症医学科(16.00%),普通外科、全科医学科和神经外科(各 10.80%),老年医学科(8.10%),呼吸内科、肿瘤内科和消化内科(各 5.40%)等。

2.1.2 药敏试验结果统计 见表 2。

2.2 耐药基因检测结果 所有 CRKP 菌株,扩增阳性产酶基因型包括 3 种:KPC、NDM、IMP。基因测序结果显示分别为 KPC-2、NDM-1 和 IMP-4 基因型见图 1、2、3。

2.3 药敏试验 MHT 对所筛选的菌株进行产碳青霉烯酶表型确证,46 株 CRE 中,MHT(+) 33 株(71.70%),见图 4。

2.4 CIM 试验结果判读 若美罗培南纸片的抑菌圈直径为 6~15 mm,则判断待测菌株产碳青霉烯酶,

若≥19 mm,则判断待测菌株不产碳青霉烯酶,若抑
菌圈直径在 16~18 mm,则不能确定是否产酶^[8]。本
次试验结果显示 46 株测试菌株均为阳性(100.00%)
见图 5。

表 1 引物序列及产物长度

目的基因	引物名称	引物序列(5'-3')	产物(bp)
blaKPC	Forward	GTA TCG CCG TCT AGT TCT GC	638
	Reverse	GGT CGT GTT TCC CTT TAG CC	
blaIMP	Forward	GAG TGG CTT AAT TCT CRA TC	183
	Reverse	CCA AAC YAC TAS GTT ATC T	
blaVIM	Forward	CGC GGA GAT TGA RAA GCA AA	247
	Reverse	CGC AGC ACC RGG ATA GAA RA	
blaSME	SME-F1	ACT TTG ATG GGA GGA TTG GC	551
	SME-R1	ACG AAT TCG AGC ATC ACC AG	
blaGES	GES-F	GCT TCA TTC ACG CAC TAT T	323
	GES-MR	CGA TGC TAG AAA CCG CTC	
blaOXA48	Forward	GCT TGA TCG CCC TCG ATT	281
	Reverse	GAT TTG CTC CGT GGC CGA AA	
blaNDM-1	Forward	TCC TTG ATC AGG CAG CCA CC	591
	Reverse	CGC ATT AGC CGC TGC ATT GA	

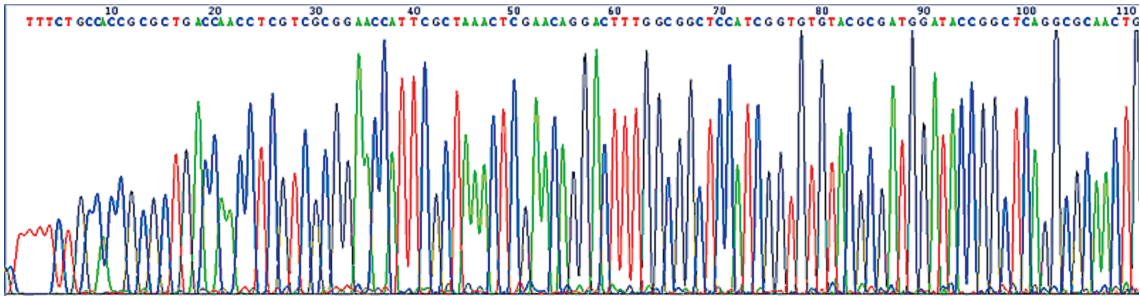


图 1 KPC-2 基因测序图(部分)

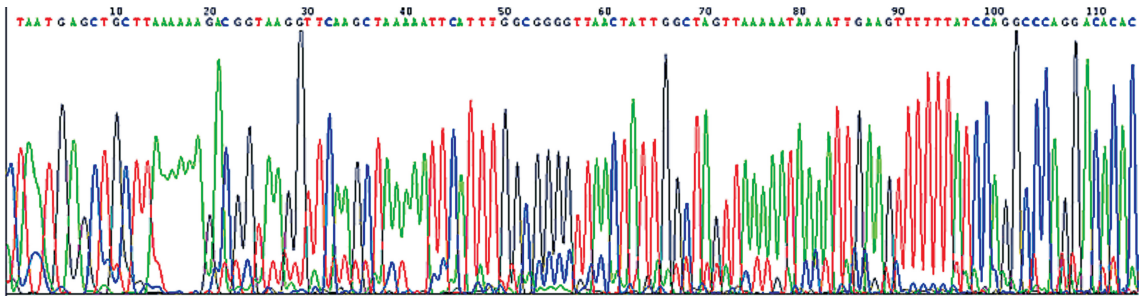


图 2 NDM-1 基因测序图(部分)

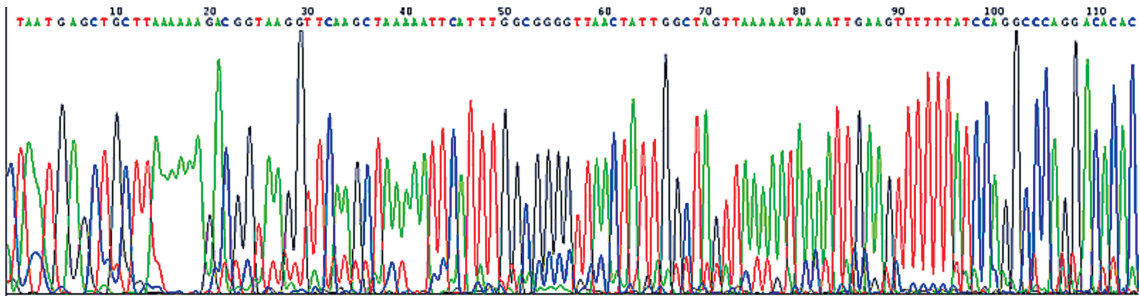
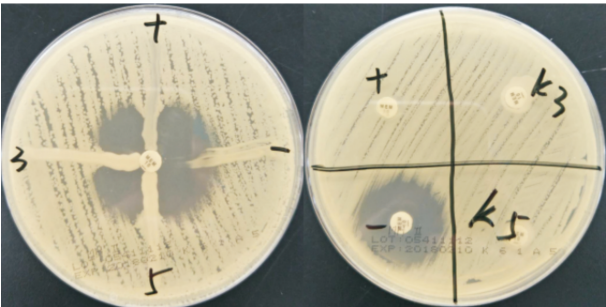
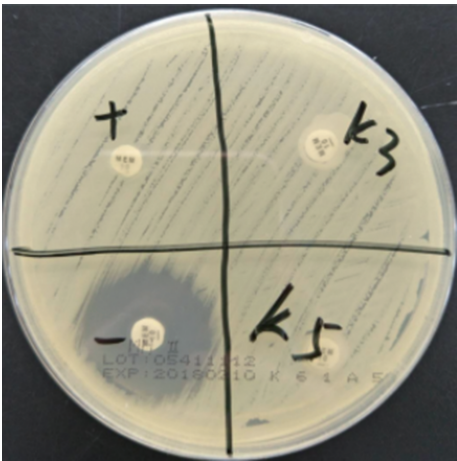


图 3 IMP-4 基因测序图(部分)



注：+表示阳性对照，-表示阴性对照。

图 4 MHT 结果(3、5 号均为阳性标本)



注：+表示阳性对照，-表示阴性对照。

图 5 CIM 试验结果(3、5 号均为阳性标本)

2.5 MLST 序列分型结果 MLST 分型结果显示：46 株 CRKP 包括 8 种 ST 型别，ST11 型有 33 株，占 71.70%，为最常见型别。其次，ST437、ST15、ST23、ST147、ST439 和 ST1955 各 2 株，ST17 有 1 株。其中，33 株 ST11 型菌株均携带有 bla KPC-2 基因，其中 1 株 ST11 型携带两种耐药基因：bla KPC-2 和 bla IMP-4 基因，另 1 株 ST11 型携带 bla KPC-2 和 blaNDM-1 基因。46 株 CRKP 中，33 株产 KPC-2 型碳青霉烯酶菌株为同一群，均为产 KPC-2 型碳青霉烯酶的 ST11 型，ST17 型属于一个群，而其余 ST 型属于一群。

表 2 46 株测试菌的药物敏感试验结果分析[n(%)]

抗菌药物	耐药(R)	中介(I)	敏感(S)
氨苄西林	46(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
哌拉西林/他唑巴坦	44(96.00)	2(4.00)	0(0.00)
头孢西丁	46(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
头孢曲松	46(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
头孢吡肟	42(91.00)	4(9.00)	0(0.00)
氨曲南	46(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
厄他培南	35(76.00)	11(24.00)	0(0.00)
美罗培南	40(87.00)	6(13.00)	0(0.00)
亚胺培南	46(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
阿米卡星	27(59.00)	10(22.00)	9(19.00)

续表 2 46 株测试菌的药物敏感试验结果分析[n(%)]

抗菌药物	耐药(R)	中介(I)	敏感(S)
庆大霉素	37(80.00)	1(2.00)	8(27.00)
环丙沙星	40(87.00)	3(6.50)	3(6.50)
左氧氟沙星	40(87.00)	0(0.00)	6(13.00)
替加环素	4(9.00)	5(11.00)	37(80.00)
氨苄西林/舒巴坦	46(46.00)	0(0.00)	0(0.00)
哌拉西林	46(46.00)	0(0.00)	0(0.00)
头孢呋辛	46(46.00)	0(0.00)	0(0.00)
头孢替坦	46(46.00)	0(0.00)	0(0.00)
头孢他啶	46(46.00)	0(0.00)	0(0.00)
头孢唑林	46(46.00)	0(0.00)	0(0.00)

3 讨 论

3.1 CRKP 耐药现状严峻 CRKP 的感染已成为院内感染死亡的独立危险因素^[2-4]，对其细菌特征和耐药机制的研究显得尤为重要。我国自连云港第一人民医院 2010 年 5 月 8 日分离到第 1 株 CRKP 以来，CRKP 分离率逐年上升，2015 年 CRKP 分离率(22.37%)远高于江苏省(12.70%)和全国平均水平(7.60%)^[5]。不同地区不同医院由于地域不同、用药习惯的不同导致不同的耐药趋势出现，本研究收集到本院的 46 株测试菌株对头孢类抗菌药(除头孢吡肟 91.00%外)的耐药率均为 100.00%，亚胺培南耐药率为 100.00%，而美罗培南耐药率为 87.00%，中介率为 13.00%，厄他培南耐药率为 76.00%，中介率为 24.00%，3 种碳青霉烯类药物均处于中介耐药水平(亚胺培南、美罗培南 MIC 2.0~4.0 μg/mL 或厄他培南 MIC 为 ≥2.0 μg/mL)，其他几类抗菌药(氨基糖苷类、喹诺酮类等)均表现为高耐药性，这些菌株的出现对临床治疗选择抗菌药提出了极大挑战。

3.2 耐碳青霉烯酶表型确证试验 实验结果显示，MHT 检测碳青霉烯酶阳性率为 71.70%，而 CIM 在本次试验中阳性率达到 100.00%，可见该试验用于检测产碳青霉烯酶具有可靠性。而且 2018 年 CLSI^[13]已删除了 MHT 作为确证试验，该试验主要是对 A 类碳青霉烯酶(尤其是 KPC 型)敏感度高，易漏检其他类型。

3.3 PCR 扩增结果分析 46 株 CRKP 菌株，经 PCR 扩增和测序结果显示，有 KPC-2、NDM-1 和 IMP-4 3 种基因型的存在和流行，其中产 KPC-2 型碳青霉烯酶的 ST11 型为该院 CRKP 的主要型别，这与 2017 年中国上海报道的流行型别一致^[6]。MLST 分型同源性结果显示有 10 株来自不同科室、不同时间的细菌进化来源相近，均属于 ST11 型，为同一型别，说明院内可能出现耐药菌株的传播流行，临床各科室和医院感染控制部门也开始高度关注并采取有效的防控措施。

3.4 MLST 分型结果分析 研究结果显示该院 CRKP 的耐药机制以产 KPC-2 型碳青霉烯酶的 ST11 型菌株为主,同时存在其他碳青霉烯酶和 ST 型别。目前虽有超过 115 种 ST 型菌株中发现 KPC 酶^[7],而全球最主要型别为 ST258 和 ST11,二者仅有一个管家基因 *tonB* 之差,中国地区以 ST11 为主要型别,欧美则以 ST258 型为主。研究显示 *blaKPC* 基因多位于质粒上,这些质粒包括 *IncF*(*FIK1*、*FIK2* 和 *FIA*), *IncI2*, *IncX*, *IncA/C*, *IncR* 和 *ColE1*^[7]。有研究表明, *blaKPC* 基因常存在于 *IncF* 型质粒^[8-11],质粒则主要通过转座子 *Tn4401* 介导耐药基因的传播^[12-15],转座子 *Tn4401* 携带 KPC 耐药基因可插入不同质粒中并随之水平转移,导致耐药基因的流行传播,这是造成 *blaKPC* 基因流行的原因之一。

3.5 不足与展望 由于实验条件有限,本次研究设计的引物和测定方法可能不足以囊括所有该院的 CRKP 耐药基因型导致尚有未检出耐药基因的菌株,也可能有新的基因型出现而未能发现,本课题组也会继续监测耐药菌株的变迁和耐药机制的继续深入研究,耐药质粒的传播机制等,以期能够持续掌握本院的 CRKP 流行与耐药机制,为临床合理使用抗菌药和加强院感监测提供科学、准确的实验室依据。

4 结 论

本次实验研究本院 CRKP 菌株的耐药机制是以产 KPC-2 型碳青霉烯酶的 ST11 型为主,也是本院耐碳青霉烯肠杆菌科细菌的主要类型,并存在不同科室的克隆传播,为医院院内感染工作和感染防控提供科学依据,也提出问题,究竟存在哪种质粒的传播,以及研究切断质粒传播途径和运用转座子特性研发阻断途径等控制耐药菌株的流行分子学方法尤为迫切,也更加确证抗菌药合理规范使用,从源头上减少耐药菌产生的重要性。另外,现行的院感防控措施是否行之有效,更全面的防控措施和更完善的消毒灭菌隔离等控制流行措施有待研究开发和有效运行。

参考文献

- [1] HAMZAOUI Z, OCAMPO-S A, MAAMAR E, et al. An Outbreak of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae*, Associated with *OmpK35* and *OmpK36* Porin Loss in Tunisia[J]. *Microb Drug Resist*, 2018, 24(8): 1137-1147.
- [2] Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-seven Informational Supplement; M100 S27. [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2017.
- [3] HONG S S, KIM K, HUH J Y, et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding class A carbapenemases [J]. *Ann lab Med*, 2012, 32(5): 359-361.

- [4] 叶相如, 胡必杰, 周春妹, 等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌感染与定植患者预后相关因素分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(11): 2489-2491.
- [5] 国家卫生计生委合理用药专家委员会, 全国细菌耐药监测网. 2015 年全国细菌耐药监测报告[J]. *中国执业药师*, 2016(3): 3-8.
- [6] LIU J, YU J, CHEN F, et al. Emergence and establishment of KPC-2-producing ST11 *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Shanghai, China[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018, 37(2): 293-299.
- [7] CHEN L, MATHEMA B, CHAVDA K D, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding[J]. *Trends Microbiol*, 2014, 22(12): 686-696.
- [8] MUNOZ-PRICE L S, POIREL L, BONOMO R A, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases[J]. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13(9): 785-796.
- [9] SHEN P, WEI Z, JIANG Y, et al. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among *Enterobacteriaceae* in China[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(10): 4333-4338.
- [10] JIANG Y, YU D, WEI Z, et al. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying *bla* (KPC-2), *bla* (DHA-1), *qnrB4*, and *armA* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(9): 3967-3969.
- [11] CHEN L, CHAVDA K D, MELANO R G, et al. Comparative genomic analysis of KPC-encoding pKpQIL-like plasmids and their distribution in New Jersey and New York hospitals[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(5): 2871-2877.
- [12] CUZON G, NAAS T, NORDMANN P. Functional characterization of *Tn4401*, a *Tn3*-based transposon involved in *blaKPC* gene mobilization[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(11): 5370-5373.
- [13] Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-seven Informational Supplement; M100 S27. [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2018.
- [14] 张晓慧, 张加玲, 戎建荣, 等. 耐碳青霉烯肠杆菌科细菌的耐药基因研究[J]. *中国药物与临床*, 2018, 18(4): 627-630.
- [15] YANG J, YE L, GUO L, et al. A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital; dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395 [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2013, 19(11): 509-515.

(收稿日期: 2019-09-09 修回日期: 2020-02-10)