

# 金华武义社区耐氨苄西林流感嗜血杆菌的流行现状及耐药性研究

董叶青,董春富,俞增仙,陶兴和

浙江武义第一人民医院,浙江 武义 321200

**摘要:** **目的** 明确金华武义社区临床分离耐氨苄西林流感嗜血杆菌流行现状及耐药性变化。 **方法** 收集金华武义社区 2015 年 11 月-2017 年 6 月临床呼吸道标本检出的 163 株流感嗜血杆菌并测定氨苄西林耐药率和耐药谱;通过多位点序列分型技术(mST)对所有菌株进行分子遗传学分析,明确亲缘关系。 **结果** 本次研究共检出 68 株耐氨苄西林流感嗜血杆菌,耐药率为 41.72%。氨苄西林耐药株对复方新诺明(75.71% vs. 31.37%,  $\chi^2 = 32.65$ ,  $P < 0.001$ )、头孢克洛(67.14% vs. 9.80%,  $\chi^2 = 61.60$ ,  $P < 0.001$ )、头孢呋辛(42.86% vs. 8.82%,  $\chi^2 = 27.42$ ,  $P < 0.001$ )和阿莫西林/克拉维酸(21.43% vs. 0%,  $\chi^2 = 12.97$ ,  $P < 0.001$ )的耐药率比氨苄西林敏感株高,差异均有统计学意义( $P < 0.001$ )。所有菌株对头孢噻肟、利福平、氧氟沙星敏感。在 68 株氨苄西林耐药株中,共检出  $\beta$ -内酰胺酶阳性 39 株(57.35%)。mST 结果显示 68 株分离株共获得 30 个已知 ST 型及 11 个新的 ST 型,且以 ST-422(7 株,17.07%)为主。系统进化树显示有两个明显的分支 Group I 和 Group II,且分离株主要存在于 Group II 中。最小生成树图显示 6 株新的 ST 型与 2~3 个已知基因型同属于一个克隆群,具有基因同源性。 **结论** 金华武义社区耐氨苄西林流感嗜血杆菌对复方新诺明、头孢克洛抗生素呈现出严重耐药性,而头孢噻肟、氧氟沙星可作为产酶菌株临床治疗的首选药物。流行菌株的流行呈散发趋势,ST-422 为其中的一个优势克隆值得进一步关注。

**关键词:** 氨苄西林耐药;流感嗜血杆菌;多位点序列分型;克隆播散

**中图分类号:** R378.4 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)08-1012-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.08.034

流感嗜血杆菌是社区获得性肺炎(community acquired pneumonia, CAP)、慢性阻塞性肺疾病(chronic

**基金项目:** 金华科技局社会发展项目(2017-4-078)

**作者简介:** 董叶青(1979-),女,本科学历,副主任技师,主要从事临床微生物研究工作。

obstructive pulmonary disease, COPD)急性加重患者最主要致病菌<sup>[1]</sup>之一。社区呼吸道感染更多依赖临床医生的经验性治疗,抗生素的频繁和不恰当的使用导致了抗生素耐药呼吸细菌的获取和传播。近年来,流感嗜血杆菌对氨苄西林、复方新诺明等抗生素呈逐年

非结核分枝杆菌有关,需进一步行菌种鉴定或 MBP64 检测。

综上所述,痰检找抗酸杆菌受多种因素影响,结核病的实验室检测手段如痰涂片、痰培养和 TB-DNA 等方法各有优劣,但 BD-960 培养法相对阳性率、准确率更高,仍是确诊肺结核的金标准,但还需结合其他检测方法联合判断,而且除了依赖于实验室诊断,特别是痰菌阴性患者,仍需进一步结合患者有无密切接触史,临床表现,影像学结果等进行综合诊断分析。

## 参考文献

- [1] Rishi S, Sinha P, Malhotra B, et al. A comparative study for the detection of *Mycobacteria* by BACTEC MGIT 960, Lowenstein Jensen media and direct AFB smear examination[J]. Indian J Med Microbiol, 2007, 25(4): 383-386.
- [2] 曹英迪. BACTEC MGIT-960 结核菌快速培养 800 例分析[J]. 河南预防医学杂志, 2017, 28(3): 186-187.
- [3] 王雅宁. 荧光定量 PCR 技术检测结核杆菌临床应用分析[J]. 实用预防医学, 2012, 19(9): 1404-1406.

- [4] 余丽, 李海成, 黎贞燕, 等. 结核菌及其耐药性不同检测方法的临床应用评价[J]. 广东医学, 2017, 38(2): 190-193.
- [5] 邹晓艳, 杨德远, 孔昌盛, 等. 肺结核病患者痰标本性状及采样时间与抗酸杆菌阳性结果分析[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(3): 339-341.
- [6] 赵雁林, 刘宇红, 姜广路, 等. 痰涂片镜检查标准化操作及质量保证手册[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2009: 152-153.
- [7] 邓章莉, 吴道深, 李彦良, 等. 110 例耐药肺结核病临床特征分析[J]. 结核病与肺部健康杂志, 2015, 4(2): 113-115.
- [8] 杜鹏, 郑文斌, 卢留珠, 等. Xpert MTB/RIF 和荧光定量 PCR 在痰液标本中快速检测结核分支杆菌的比较[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(4): 656-659.
- [9] 陈芳, 项忠元. T 淋巴细胞干扰素释放试验在检测结核杆菌感染中的应用[J]. 实用预防医学, 2017, 24(3): 272-274.
- [10] 张帆, 刘守江, 魏巍, 等. 2 月末结核分枝杆菌阳性初治肺结核患者菌型鉴定结果分析[J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(10): 1754-1756.
- [11] 赵冰, 侯萍, 黄静, 等. 高敏感度酶联免疫吸附测定法检测分泌蛋白 MPB64 对于活动性肺结核诊断的价值[J]. 中国防痨杂志, 2017, 39(12): 1303-1308.

收稿日期: 2018-09-28

上升趋势,耐氨苄西林  $\beta$ -内酰胺酶阴性流感嗜血杆菌 ( $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant, BLNAR) 检出率日益增加<sup>[2-3]</sup>,因此,对流感嗜血杆菌的流行趋势和有关抗生素耐药机制进行关注是至关重要的。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

1.1.1 菌株入选标准及来源 (a) 浙江武义第一人民医院门诊或住院后 48 h 内采集呼吸道标本培养的流感嗜血杆菌;(b)排除转院病人(外院住院时间超过 48 h 及 1 月内有住院史的病人)。质控菌株流感嗜血杆菌 ATCC49247,金黄色葡萄球菌 ATCC25923 来自浙江省临检中心。

1.1.2 主要仪器与试剂细菌 鉴定及耐药谱分析采用法国梅里埃 VITEK2 Compact 全自动微生物鉴定系统及 ATB Expression 半自动药敏分析仪;PCR 仪为美国 ABI 公司产品;电泳仪、凝胶成像仪为美国 Bio-Rad 公司产品。流感嗜血杆菌培养基和流感嗜血杆菌药敏试验琼脂培养基购自英国 OXOID 公司;氨苄西林、复方新诺明、头孢噻肟、氧氟沙星、头孢呋辛、氯霉素、四环素、头孢克洛、阿莫西林/克拉维酸、头孢硝噻吩纸片均购自英国 OXOID 公司;PCR 试剂盒购自大连 TaKa-Ra 公司;PCR 引物合成及 PCR 扩增产物测序由杭州铂尚生物有限公司完成。API-NH 鉴定卡为法国梅里埃产品。

## 1.2 方法

1.2.1 流感嗜血杆菌的分离鉴定 送检标本阳性菌株按照微生物检验标准规程操作<sup>[4]</sup>,做卫星试验和 V、X、V+X 因子需求试验,采用全自动微生物鉴定系统 VITEK2 Compact 进行流感嗜血杆菌的鉴定,部分菌株采用 API-NH 鉴定卡复核。

1.2.2 药敏试验 应用 ATB Expression 配套 ATB HAEMO 药敏条对流感嗜血杆菌进行 10 种抗菌药物的药敏试验。采用 K-B 法分别在 HTM 平板上进行氨苄西林、复方新诺明、头孢噻肟、氧氟沙星、头孢呋辛、氯霉素、四环素、头孢克洛、阿莫西林/克拉维酸、利福平药敏试验;同时,对所有流感嗜血杆菌使用琼脂稀释法测定氨苄西林的最低抑菌浓度 (minimun inhibitory concentration, MIC)。所有结果按 CLSI2014 年发布的相关标准判定。将氨苄西林 MIC  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ , KB  $\leq 18 \text{ mm}$  确定为氨苄西林耐药菌株。

1.2.3  $\beta$ -内酰胺酶 试验采用头孢硝噻吩纸片法进行,将待测流感嗜血杆菌涂于用无菌蒸馏水浸湿的纸片上,变红者为阳性,1 h 后不变色为阴性。

1.2.4 DNA 模板 提取新鲜培养细菌过夜,从 HAE 平板上刮取适量置于含有 200  $\mu\text{l}$  去离子水的 1.5 ml 的 EP 管中,混匀,100  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 10 min,然后 10 000 rpg/min 离心 5 min,取上清至 0.5 ml 的 EP 管中,-20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.2.5 mlST 分型方案 参考 Emma 等<sup>[5]</sup>于 2003 年提出的流感嗜血杆菌 mlST 方案,选取 7 个管家基因 (adk、atpG、frdB、fuck、mdh、pgi 和 recA7) 进行 PCR 扩增及测序 (表 1)。50  $\mu\text{l}$  的 PCR 反应体系:10 $\times$ Taq PCR Buffer 5  $\mu\text{l}$ ,上下游引物 (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) 各 1  $\mu\text{l}$ , rTag DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.15  $\mu\text{l}$ , 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$  5  $\mu\text{l}$ , 2.5 mM dNTP 5  $\mu\text{l}$ , DNA 模板 3  $\mu\text{l}$ ,去离子水补足至 50  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应程序:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s,进行 35 个 PCR 循环;72  $^{\circ}\text{C}$  10 min 延伸。扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳,条带阳性标本进行双向测序。

表 1 流感嗜血杆菌 mlST 方案引物序列

管家基因名称	引物序列	PCR 产物长度 (bp)
adk	5'-GGTGCACCGGTGCAGGTAA-3'	477
	5'-CCTAAGATTTTATCTAACTC-3'	
atpG	5'-ATGGCAGGTGCAAAAGAGAT-3'	447
	5'-TTGTACAACAGGCTTTTGCG-3'	
frdB	5'-CTTATCGTTGCTCTTGCCGT-3'	489
	5'-TTGGCACTTTCCACTTTTCC-3'	
fuck	5'-ACCACTTTCGGCGTGGATG-3'	345
	5'-AAGATTCCCAGGTGCCAGA-3'	
mdh	5'-TCATTGTATGATATTGCCCC-3'	405
	5'-ACTTCTGTACCTGCATTTTG-3'	
pgi	5'-GGTGAAAAATCAATCGTAC-3'	468
	5'-ATTGAAAGACCAATAGCTGA-3'	
recA	5'-ATGGCAACTCAAGAAGAAA-3'	426
	5'-TTACCAAACATCAGCCTAT-3'	

1.2.6 mlST 数据分析 双向测序后经 Chromash 和 Seqman 软件分析得到拼接有效的序列,将其放到流感嗜血杆菌 mlST 数据库 (<https://pub.mlst.org/hinfluenzae/>) 上进行比对,得到每个管家基因的等位基因号。adk-atpG-frdB-fuck-mdh-pgi-recA7 七个管家基因的等位基因号按此顺序排列形成相应的等位基因谱,确定其序列型 (sequence type, ST)。

1.2.7 系统发育树、最小生成树分析 将测得的 7 个等位基因序列串联拼接,采用 MEGA5 软件中的 NJ (neighbor-joining) 法构建系统发育树、可信度 Bootstrap 值设为 1 000。基于菌株的等位基因号和序列型,应用 phyloviz-2.0 软件程序进行最小生成树图形绘制。

1.2.8 统计学分析 采用 WHONET 5.6、SPSS 21.0 软件进行分析,统计方法采用 $\chi^2$  检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病原菌分布 2015 年 11 月-2017 年 6 月共分离出 163 株流感嗜血杆菌。其中氨苄西林耐药株 68 株,占 41.72%。男性患者检出 42 株(占 61.76%),女性患者检出 26 株(占 38.24%),科室分布以儿科病房为主(43 株,占 63.24%),其次为呼吸病房(6 株,占 8.82%)。

2.2 药敏试验结果 氨苄西林敏感株对复方新诺明、头孢克洛、头孢呋辛和阿莫西林/克拉维酸抗菌药物的耐药率普遍较低,分别为 31.37%、9.80%、8.82% 和 0%;而耐氨苄西林流感嗜血杆菌对上述抗菌药物却具有较高的耐药率,分别为 75.71%、67.14%、42.86% 和 21.43%,差异均有统计学意义( $P<0.001$ ),见表 2。氨苄西林耐药株和敏感株对头孢噻肟、利福平和氧氟沙星敏感性好,耐药率均为 0%。68 株氨苄西林耐药株中检出  $\beta$ -内酰胺酶阳性 39 株(57.35%), $\beta$ -内酰胺酶阴性 29 株(42.65%)。

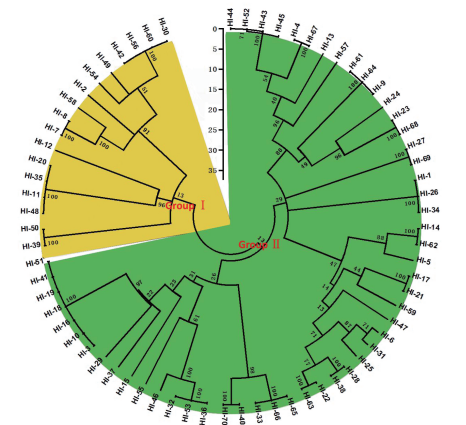
表 2 流感嗜血杆菌氨苄西林耐药株与敏感株对 9 种抗菌药物的耐药率

抗菌药物	AMP 耐药株(n=68)		AMP 敏感株(n=95)		$\chi^2$ 值	P 值
	耐药株数	耐药率(%)	耐药株数	耐药率(%)		
复方新诺明	53	75.71	32	31.37	32.65	<0.001
头孢克洛	47	67.14	10	9.80	61.60	<0.001
头孢呋辛	30	42.86	9	8.82	27.42	<0.001
阿莫西林/克拉维酸	15	21.43	0	0	12.97	<0.001
四环素	5	7.14	2	1.96	-	-
氯霉素	4	5.71	0	0	-	-
头孢噻肟	0	0	0	0	-	-
利福平	0	0	0	0	-	-
氧氟沙星	0	0	0	0	-	-

注:AMP:氨苄西林。

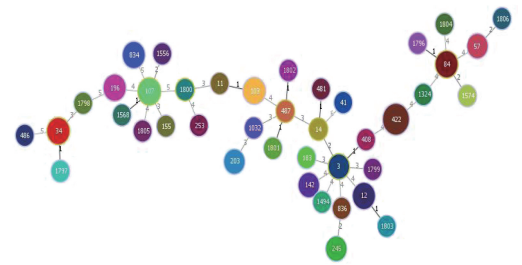
2.3 mlST 分型 68 株耐氨苄西林流感嗜血杆菌株共检出 41 种 ST 型。结果以 ST-422 型为主,共检出 7 株,占 17.07%,其次、ST-84、ST-12、ST-34、ST-834、ST-196 和 ST-103 型各 3 株,ST-107、ST-3、ST-253、ST-245、ST-203、ST-57、ST-155、ST-142、ST11 和型各 2 株,ST41、ST14、ST836、ST487、ST486、ST481、ST408、ST183、ST1032、ST1324、ST1494、ST1556、ST1568 和 ST1574 型各 1 株。本次研究还发现 11 株新的 ST 型,经递交至 Pub mlST 数据库后获得的编号,为 ST1796-ST1806。

2.4 系统发育分析 应用 MEGA 6.0 软件,采用 Neighbor-Joining 算法,可信度 Bootstrap 值设为 1 000,构建基于 7 个管家基因核苷酸序列,串联拼接后,分别对 70 株耐氨苄西林的流感嗜血杆菌进行邻接关系树分析(图 1)和最小生成树分析(图 2)。邻接关系树结果显示有两个明显的分支 Group I 和 Group II。其中,53 株耐氨苄西林的流感嗜血杆菌存在于 Group II 中,而剩下的 15 株则位于 Group I 中。最小生成树图显示 6 株新的 ST 型与已知 ST 型(1801-1487-21802、84-11796-21574、1797-134、1803-112、1806-257)在系统进化上具有亲缘关系。



注:菌株编号标示在分支的顶端。

图 1 社区耐氨苄西林流感嗜血杆菌的系统发生树



注: 每个圆圈代表一个独立的 ST 型,圆圈的大小代表菌株数目的多少,两个 ST 连线上的数字表示 ST 之间的等位差异的数量(≤2 表示两个或三个 ST 之间有相互联系)。

图 2 社区耐氨苄西林流感嗜血杆菌的最小生成树

3 讨论

流感嗜血杆菌是一种重要的引起社区感染的细菌病原体,如急性中耳炎、急性鼻窦炎、慢性支气管炎急性加重(acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease, AECOPD)、社区获得性肺炎(CAP)<sup>[6-7]</sup>。作为经验性药物氨苄西林在流感嗜血杆菌中的耐药性在全球范围内很普遍,在不同的欧洲国家和美国北部,发病率从 8% 到 30% 不等,甚至超过 50%<sup>[8]</sup>。本社区流感嗜血杆菌对氨苄西林耐药率为 41.72%,与国内外报道相近<sup>[9]</sup>。这些耐药菌株通常分布在男性、儿童



患者的呼吸道分泌物中,在春夏换季期间(3-5月)检出最高(40.98%),与有关报道不同<sup>[10]</sup>。这可能与不同地方气候、温差等影响,男性、儿童人群易患呼吸道疾病并且与区域传播流行有关。

呼吸道感染了氨苄西林耐药流感嗜血杆菌,可通过克隆传播在不同区域流动。这些耐药菌株一旦流行播散,必将会为临床治疗带来麻烦。当前在全球范围内流行最广的流感嗜血杆菌克隆复合体属于 ST-6,病死率为 17%<sup>[11]</sup>。但近期研究发现大多数侵袭性疾病病例都是与 ST-23 或 ST-4(12,13,15,19,28,34)相关的菌株引起的<sup>[12]</sup>。本研究通过多重聚合酶链反应技术(PCR)与多位点序列分型技术(mlST)相结合对本地区分离的耐药株进行检测,发现 ST 型呈 41 种多样化分布,并以 ST-422 最为多见,还发现 11 株新的 ST 型。得到的 ST 分型结果用 MEGA 软件进行分析发现两个遗传上差异较大的分支,其中 cluster II 包含大多数的菌株。phyloz 软件设计的最小生成树显示 6 株新的 ST 型(1801-1487-21802、84-11796-21574、1797-134、1803-112、1806-257)与 2~3 个已知基因型同属于一个克隆群,具有基因同源关系。但从全局数据来看,本地区耐氨苄西林流感嗜血杆菌以散发为主,没有发现主要的流行克隆,这可能与它在社区流行有关,今后须继续进行耐药株的分子流行病学监测。

目前研究发现:流感嗜血杆菌耐药机制主要是细菌产生的  $\beta$ -内酰胺酶水解氨苄西林,并使其失活。 $\beta$ -内酰胺酶可由多种基因编码,其中,由质粒介导的 TEM-1 基因最为多见,其次是 ROB-1 型<sup>[13]</sup>。这种耐药机制导致氨苄西林耐药称 BLPAR( $\beta$ -内酰胺酶阳性氨苄西林耐药)流感嗜血杆菌,这些耐药株对头孢克洛、头孢呋辛耐药率都在 40%以上,对阿莫西林/克拉维酸耐药率为 21.43%,对复方新诺明耐药率高达 75.71%。本社区分离到的氨苄西林耐药株中, $\beta$ -内酰胺酶阳性菌占多数(57.35%),与国内有关报道相同<sup>[3]</sup>。但在日本, $\beta$ -内酰胺酶阴性氨苄西林耐药(BLNAR)流感嗜血杆菌占流感嗜血杆菌临床分离株的大部分<sup>[14]</sup>,BLNAR 分离株是由于 *ftsI* 基因氨基酸位点突变引起青霉素结合蛋白(PBP3)空间构象改变,使其对氨苄西林亲和力下降<sup>[15]</sup>导致对氨苄西林耐药。此外,本研究发现头孢噻肟、利福平和氧氟沙星对流感嗜血杆菌都有很好的抗菌活性。由此可见,对于 BLNAR 流感嗜血杆菌, $\beta$ -内酰胺酶/ $\beta$ -内酰胺酶抑制剂和第二类头孢菌素的经验性治疗对此类患者是不适合的(约 3%)<sup>[13]</sup>。

抗生素治疗可能会导致耐药性流感嗜血杆菌菌株的出现,尤其是 BLNAR 菌株<sup>[16]</sup>。因此,流感嗜血杆菌对抗生素的耐药性需要持续的关注,并采用有效的检测方法和合理的抗生素使用策略。

(致谢:在此非常感谢浙江大学医学院附属邵逸夫医院检验科张钧老师、阮陟老师、孔莹莹老师的大力指导和帮助!)

## 参考文献

- [1] 马青变. 急诊社区获得性呼吸道感染诊疗新进展[J]. 中国急救医学, 2016, 36(1): 22-25.
- [2] 杨小兰, 刘伟阳, 孙增辉. 临床 197 株流感嗜血杆菌的分布及耐药性分析[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(5): 774-776.
- [3] 林华杰, 周世娟, 周文娟. 2013-2015 年惠东地区儿童呼吸道流感嗜血杆菌感染流行病学特征及耐药性分析[J]. 实用预防医学, 2017, 24(7): 831-833.
- [4] 周庭银, 倪语星, 胡继红, 等. 临床微生物检验标准化操作规程[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2015: 247-253.
- [5] Meats E, Feil EJ, Stringer S, et al. Characterization of encapsulated and nonencapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1623-1636.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会. 中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016 年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(4): 253-278.
- [7] 赵春江, 张菲菲, 王占伟, 等. 2012 年中国成人社区获得性呼吸道感染主要致病菌耐药性的多中心研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2015, 38(1): 18-22.
- [8] 王爱华. 流感嗜血杆菌感染与耐药[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(4): 256-258.
- [9] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2015 年 CHINET 细菌耐药性监测中国感染与化疗杂志[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(6): 685-694.
- [10] 江秀爱, 王荣, 张秀云, 等. 呼吸道流感嗜血杆菌的生物学分型与耐药基因的相关性研究[J]. 医学检验与临床, 2015, 26(4): 5-8.
- [11] Tuyama M, Corrêa-Antônio J, Schlackman J, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* disease in the vaccine era in Rio de Janeiro, Brazil[J]. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2017, 112(3): 196-202.
- [12] Tsang RSW, Ulanova M, et al. The changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease: emergence and global presence of serotype a strains that may require a new vaccine for control[J]. Vaccine, 2017, 35(33): 4270-4275.
- [13] Kuvat N, Nazik H, Berkiten R, et al. TEM-1 and ROB-1 presence and antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* strains, Istanbul, Turkey[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2015, 46(2): 254-261.
- [14] Wajima T, Seyama S, Nakamura Y, et al. Prevalence of macrolide non susceptible isolates among B-lactamase negative ampicillin resistant *Haemophilus influenzae* in a tertiary care hospital in Japan[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2016, 6(6): 22-26.
- [15] Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, et al. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*[J]. Antimicrob Agents Ch, 2001, 45(6): 1693-1699.
- [16] Maddi S, Kolsum U, Jackson S, et al. Ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* from COPD patients in the UK[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2017, 12(3): 1507-1518.

收稿日期: 2018-08-08