

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 冯洁, 黄晓俊, 王祥, 等. 上消化道黏膜下肿瘤的内镜下诊断及治疗进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(7): 1398-1400, 1356. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.07.051.
- [ 2 ] 徐美东, 姚礼庆, 周平红, 等. 经黏膜下隧道内镜肿瘤切除术治疗源于固有肌层的上消化道黏膜下肿瘤初探[J]. 中华消化内镜杂志, 2011, 28(11): 606-610. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-5232.2011.11.004.
- [ 3 ] 刘莹, 卢雪峰, 王亚楠, 等. 内镜经黏膜下隧道肿瘤切除术治疗上消化道黏膜下肿瘤的探讨[J]. 中华消化杂志, 2014, 34(5): 334-336. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2014.05.014.
- [ 4 ] Nonaka S, Oda I, Makazu M, et al. Endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer in the remnant stomach after gastrectomy[J]. Gastrointest Endosc, 2013, 78(1): 63-72. DOI: 10.1016/j.gie.2013.02.006.
- [ 5 ] Ohta T, Ishihara R, Uedo N, et al. Factors predicting perforation during endoscopic submucosal dissection for gastric cancer[J]. Gastrointest Endosc, 2012, 75(6): 1159-1165. DOI: 10.1016/j.gie.2012.02.015.
- [ 6 ] 杨文娟, 岳辉, 何锋坚, 等. 内镜多隧道黏膜下剥离术治疗大面积早期食管癌的临床研究(含视频)[J]. 中华消化内镜杂志, 2016, 33(5): 304-307. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-5232.2016.05.008.
- [ 7 ] Catalano F, Rodella L, Lombardo F, et al. Endoscopic submucosal dissection in the treatment of gastric submucosal tumors: results from a retrospective cohort study[J]. Gastric Cancer, 2013, 16(4): 563-570. DOI: 10.1007/s10120-012-0225-7.
- [ 8 ] 邓磊, 于劲, 樊超强, 等. 内镜黏膜下隧道剥离术治疗食管固有肌层肿瘤的效果评价[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(24): 2500-2503.
- [ 9 ] 宋希暖, 孙美玲, 黄秀强, 等. 内镜下隧道式黏膜剥离术治疗食管黏膜下肿瘤的临床疗效观察[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2015, 24(12): 1421-1422. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5709.2015.12.003.
- [ 10 ] 王瑾, 秦金玉, 郭天娇, 等. 常规内镜黏膜下剥离术与经内镜黏膜下隧道剥离术治疗食管大面积黏膜病变的疗效及并发症分析[J]. 四川大学学报(医学版), 2015, 46(6): 896-900.
- [ 11 ] 周正斌, 黄震, 成宏伟, 等. 经内镜隧道式黏膜下剥离术治疗大面积食管早癌及癌前病变[J]. 中华消化内镜杂志, 2014, 31(12): 733-735. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-5232.2014.12.014.
- [ 12 ] 熊英, 胡海清, 高颖, 等. 贲门周围固有肌层良性肿瘤经食管隧道内镜下切除的临床观察[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(46): 3655-3657. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2014.46.011.
- [ 13 ] Höbel S, Baumbach R, Dautel P, et al. Single centre experience of endoscopic submucosal dissection (ESD) in premalignant and malignant gastrointestinal neoplasia[J]. Z Gastroenterol, 2014, 52(2): 193-199. DOI: 10.1055/s-0033-1356065.
- [ 14 ] 单宝珍, 徐柳, 李胜保, 等. 两种方法治疗食管上皮内瘤变的临床研究[J]. 重庆医学, 2014, 43(28): 3739-3740, 3743. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2014.28.014.
- [ 15 ] 和泽源, 杨瑞芬, 杨艳辉, 等. 内镜黏膜下剥离术治疗结肠良性肿瘤[J]. 医学临床研究, 2014, 31(1): 172-173. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7171.2014.01.065.
- [ 16 ] Zhang J, Yang JM, Xu QS, et al. The accumulating appreciation of endoscopic submucosal dissection in the treatment of gastrointestinal neoplasms: preliminary experience in local eastern China[J]. Hepatogastroenterology, 2013, 60(126): 1257-1262. DOI: 10.5754/hge121255.

(收稿日期: 2017-10-30)

(本文编辑: 顾文景)

## 幽门螺杆菌临床抗生素耐药表型与基因突变检测的比较研究

季雪良 叶丽萍 孟飞 杨宁敏 黄智铭

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *HP*)是许多消化道疾病的病因, 因此治疗此类疾病时根除 *HP* 感染具有重要意义

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-5232.2018.05.016

基金项目: 浙江省科技厅公益技术应用研究项目(2016C33232, 2017C33192)

作者单位: 323000 浙江省丽水市人民医院 温州医科大学附属第六医院消化内科(季雪良); 浙江台州医院消化内科(叶丽萍); 杭州致远医学检验所有限公司(孟飞、杨宁敏); 温州医科大学附属第一医院消化内科(黄智铭)

通信作者: 黄智铭, Email: 35340422@qq.com

义。但是, *HP* 的根除受许多因素影响, 其中最主要的原因是细菌的耐药性, 因此合理的使用抗生素是根除 *HP* 的重要保证<sup>[1-3]</sup>。目前 *HP* 的耐药性检测主要通过药敏试验完成, 包括琼脂稀释法和 E-Test 法。但是这 2 种方法对实验室培养具有较高要求且培养周期较长。研究表明, 克拉霉素耐药主要是由于 23S *rRNA* 基因的 2142 或 2143 位突变导致的, 左氧氟沙星耐药主要是由 *gyrA* 基因编码的蛋白在 87、88、91 和 97 突变导致的<sup>[4]</sup>。本研究通过比较 DNA 测序得出的 *HP* 耐药性(基因型)与药敏试验得出的耐药性(表型)的差异, 探讨 *HP* 耐药性检测的准确性。

一、对象与方法

1. 菌株来源:对 2014 年 7 月至 2015 年 6 月因上消化道疾病在温州医科大学附属第六医院接受胃镜检查并采样的初次 HP 根除失败患者,采集其胃黏膜进行 HP 分离培养,共获得 129 株 HP,经传代培养后收集 HP 分别进行药敏试验和 DNA 测序。

2. HP 分离培养:胃黏膜样本充分研磨后接种于 5% 去纤维羊血哥伦比亚琼脂平板上并均匀涂开,随后将平板置于微需氧条件(5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>), 37℃ 培养 3 d。选择符合菌落形态鉴定的透明或半透明的针尖样菌落,进行革兰染色和尿素酶、过氧化氢酶、过氧化物酶活性试验。革兰染色阴性和 3 种酶实验全部阳性的被认为是 HP 阳性<sup>[5]</sup>。

3. HP 药敏试验:用琼脂稀释法和 E-Test 法分别进行检测。采用琼脂稀释法的 HP 菌株,其克拉霉素耐药临界点为 1 μg/mL,左氧氟沙星耐药临界点为 2 μg/mL<sup>[6-7]</sup>。用生理盐水调整 HP 浓度为 2 个麦氏单位,均匀接种于含不同抗生素的哥伦比亚血琼脂平板上。采用 E-Test 法的 HP,同样用生理盐水调整 HP 浓度为 2 个麦氏单位,然后接种到含 5% 去纤维羊血的哥伦比亚琼脂平板均匀涂开,在平板上贴上克拉霉素或者左氧氟沙星的 E-Test 试纸条。随后将所有平板置于微需氧条件(5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>), 37℃ 培养 3 d,观察 HP 生长状况。

4. HP 基因组提取:采用 Life Technologies 公司的 Invitrogen Purelink Genomic DNA Mini Kit 试剂盒进行 HP 基因组提取,具体操作按照使用说明书进行。基因组浓度使用 Life Technologies 公司的 Qubit dsDNA HS Assay Kit 试剂盒进行测定。

5. 耐药基因扩增和测序分析

(1) 耐药基因引物设计:23S rRNA 和 gyrA 基因引物来源于参考文献<sup>[8-9]</sup>。引物序列如下:23S rRNA 正向引物为 5'-GGCTCTTTGAGTCCTTTTAGGACA-3';反向引物为 5'-CTCC-ATAAGAGCCAAAGCCCTTACT-3',产物片段为 617 bp。GyrA

正向引物为 5'-TTTAGCTTATTC AATGAGCGT-3';反向引物为 5'-GCAGACGGCTTGGTAGAATA-3',产物片段为 428 bp。

(2) PCR:体系为 25 μL,其中 10×PCR 缓冲液 2.5 μL、dNTPs 2 μL、模板 DNA 2 μL、上下游引物各 1 μL、Taq 酶 0.5 μL、双蒸水 16 μL。热循环参数为:94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s,退火 30 s(23S rRNA 62℃, gyrA 50℃), 72℃ 延伸 40 s, 32 个循环,最后 72℃ 终延伸 5 min。

(3) PCR 产物鉴定及 3730XL 测序分析:PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,比对 DNA marker,对条带大小符合上述要求的 PCR 产物进行纯化和 3730XL 测序。测序结果用 Chromas 2.41 软件进行峰图突变分析,使用 Vector NTI Suite 7 软件中的 AlignX 进行序列比对。

6. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,耐药率比较使用χ<sup>2</sup> 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 药敏试验结果:临床分离得到的 129 株 HP 中,31 株对克拉霉素耐药,耐药率为 24.03%;34 株对左氧氟沙星耐药,耐药率 26.36%;对克拉霉素和左氧氟沙星双重耐药的 HP 达到 20 株(15.50%)。

2. 23S rRNA 和 gyrA 基因突变情况:克拉霉素耐药基因 23S rRNA 的检测中,共发现 68 例耐药位点突变,基因耐药率达到 52.71%,其中 2142 位点 1 例 A>G, 2143 位点 66 例 A>G, 1 例 A>C。有 7 株 HP 的耐药位点测序结果出现双峰。对左氧氟沙星耐药基因 gyrA 检测发现,共 62 例发生突变,基因耐药率达到 48.06%,其中 87 位置发生突变 38 例,91 位置发生突变 23 例,88 位置发生突变 1 例,87 和 91 位点共同突变 4 例。有 13 株 HP 的耐药位点测序结果出现双峰情况。见图 1。

3. 基因测序结果与药敏结果比较:对药敏组与测序组的克拉霉素、左氧氟沙星耐药检出率进行比较,差异具有统计学意义(表 1)。

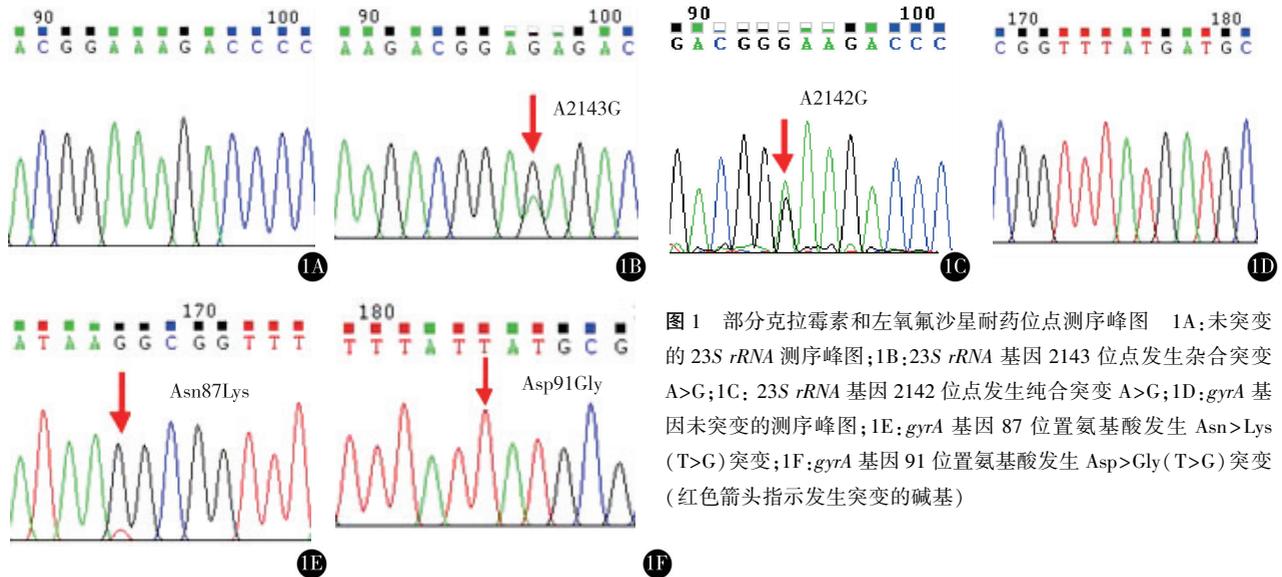


图 1 部分克拉霉素和左氧氟沙星耐药位点测序峰图 1A:未突变的 23S rRNA 测序峰图;1B:23S rRNA 基因 2143 位点发生杂合突变 A>G;1C: 23S rRNA 基因 2142 位点发生纯合突变 A>G;1D: gyrA 基因未突变的测序峰图;1E: gyrA 基因 87 位置氨基酸发生 Asn>Lys (T>G) 突变;1F: gyrA 基因 91 位置氨基酸发生 Asp>Gly (T>G) 突变 (红色箭头指示发生突变的碱基)

表 1 幽门螺杆菌药敏组与测序组耐药菌株检出率比较 [例(%)]

组别	菌株例数	克拉霉素耐药	左氧氟沙星耐药	双重耐药
药敏组	129	31(24.03)	34(26.36)	20(15.50)
测序组	129	68(52.71)	62(48.06)	43(33.33)
$\chi^2$ 值		22.438	13.006	11.11
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

药敏试验中对克拉霉素耐药的 31 株 *HP*, 有 26 株检出 23S *rRNA* 耐药位点发生突变, 突变率为 83.87%, 其中 25 例突变为 A2143G, 1 例为 A2143C, 混合感染 3 例。对左氧氟沙星耐药的 34 株 *HP* 中, 有 24 株检出 *gyrA* 基因的耐药决定区发生突变, 突变率为 70.59%, 其中 15 例在 87 位置发生突变, 9 例在 91 位置突变, 混合感染 4 例(表 2)。

表 2 幽门螺杆菌药敏组中基因突变耐药与表型耐药比较 [例(%)]

基因型突变情况	克拉霉素表型耐药( $n=31$ )	左氧氟沙星表型耐药( $n=34$ )
A2143G 突变	25(80.65)	22(64.71)
A2143C 突变	1(3.23)	-
A2143G 杂合突变(混合感染)	2(6.45)	-
A2143C 杂合突变(混合感染)	1(3.23)	-
Asn87Ile/Lys	9(29.03)	15(44.12)
Asp91Asn/Gly	11(35.48)	9(26.47)
Asn87Ile/Lys 杂合突变(混合感染)	-	1(2.94)
Asp91Asn/Gly 杂合突变(混合感染)	-	3(8.82)

注:“-”表示无

**讨论** 经典的 2 种抗生素加上 1 种质子泵抑制剂的三联疗法被广泛应用于 *HP* 感染的根除治疗, 常用的抗生素包括克拉霉素、甲硝唑、左氧氟沙星、阿莫西林等。然而随着抗生素的广泛使用, 细菌对抗生素的耐药性也在逐年增加, 其中克拉霉素耐药被认为是 *HP* 根除失败的主要原因<sup>[8-9]</sup>。目前对于 *HP* 克拉霉素和喹诺酮类药物耐药的分子机制研究比较透彻, 克拉霉素耐药主要是由于 23S *rRNA* 基因的 2142 和 2143 位点突变引起, 喹诺酮类药物耐药主要是由 *gyrA* 基因的 87、88、91 位点突变引起<sup>[10-11]</sup>。

本研究发现, 药敏组中克拉霉素和左氧氟沙星耐药率分别为 24.03% 和 26.36%, 测序组中克拉霉素和左氧氟沙星耐药率分别为 52.71% 和 48.06%, 测序组的耐药率明显高于药敏组( $P<0.01$ ), 推测主要原因可能是其他相关基因也在影响 *HP* 对抗生素的耐药性, 导致其生物学表型对抗生素是敏感的。因此, 单独运用 DNA 测序技术检测 *HP* 的耐药性可能具有耐药假阳性。

此外, 对药敏组中克拉霉素和左氧氟沙星耐药的 *HP* 进行耐药基因突变分析, 结果显示, 表型克拉霉素耐药的菌株

中, 23S *rRNA* 耐药位点突变率为 83.87%; 表型左氧氟沙星耐药的菌株中, *gyrA* 基因的耐药决定区突变率为 70.59%。这表明, 耐药基因突变的确是 *HP* 产生耐药的因素, 但并不是唯一因素, 例如外排泵系统、靶核糖体修饰、酶失活等机制也与细菌耐药发生相关<sup>[12-13]</sup>。同时, 对克拉霉素耐药的 *HP* 的基因型分析, 发现 3 例 23S *rRNA* 的 2143 位点呈现“套峰”现象, 这是由于野生型 *HP* 菌株和耐药型 *HP* 菌株的混合感染造成。在左氧氟沙星耐药的 *HP* 中, 也发现了 4 株类似的混合感染情况。此现象在国内外报道并不多见<sup>[14]</sup>, 但是我们的研究结果显示混合感染现象已经比较严重, 在克拉霉素耐药菌株中占到了 9.68%(3/31), 在左氧氟沙星耐药中占到了 11.76%(4/34)。混合感染情况应当被重视, 尤其是对于耐药株所占比例较少的样本(耐药株占 5%~30%)。

PCR 诊断技术被广泛应用于临床相关疾病的检测, 但是根据我们的实验结果, 单独运用 DNA 测序技术来诊断 *HP* 的耐药性并不是非常可靠, 可能会出现较高的耐药率, 不适合单独作为 *HP* 耐药依据, 需结合药敏试验结果。而药敏试验依赖于 *HP* 培养, 介于 *HP* 培养条件苛刻, 在临床上, *HP* 培养阳性率并不能达到 100%。另一方面, 杂菌污染也会导致阳性的 *HP* 无法进行药敏试验。因此, DNA 测序可以指导呼气试验阳性而培养阴性的患者获得其对抗生素的耐药情况。同时, 对于耐药菌株与敏感菌株混合感染率较高的地区, 尤其是耐药菌株在混合感染中所占比例较低时, 利用 DNA 测序检测是否具有混合感染是非常有必要的。因此, 对于 *HP* 的克拉霉素和左氧氟沙星耐药性判定, 需结合药敏试验和耐药基因测序, 如此才能避免医疗资源浪费, 更加合理有效地指导临床抗生素使用。

## 参 考 文 献

- [1] Shao Y, Lu R, Yang Y, et al. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* to 16 antibiotics in clinical patients[J]. J Clin Lab Anal, 2017, DOI: 10.1002/jcla.22339.
- [2] Hu Y, Zhu Y, Lu NH. Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in China[J]. Dig Dis Sci, 2017, 62(5): 1146-1154. DOI: 10.1007/s10620-017-4536-8.
- [3] Dang BN, Graham DY. *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance: a WHO high priority? [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(7): 383-384. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.57.
- [4] Nishizawa T, Suzuki H. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and molecular testing[J]. Front Mol Biosci, 2014, 1:19. DOI: 10.3389/fmolb.2014.00019.
- [5] Tong YF, Lv J, Ying LY, et al. Seven-day triple therapy is a better choice for *Helicobacter pylori* eradication in regions with low antibiotic resistance[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(46):13073-13079. DOI: 10.3748/wjg.v21.i46.13073.
- [6] 杨宁敏, 孟飞, 徐书华, 等. 基于浙江省幽门螺杆菌耐药监测大数据下的根除治疗对策研究[J]. 中华消化内镜杂志,

- 2016, 33 ( 11 ): 738-742. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-5232.2016.11.003.
- [ 7 ] Clinical and Laboratory Standards Institute. NCCLS M45-A Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline[S]. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
- [ 8 ] Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report [J]. Gut, 2017, 66 ( 1 ): 6-30. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312288.
- [ 9 ] 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌和消化性溃疡学组, 全国幽门螺杆菌研究协作组, 刘文忠, 等. 第五次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告 [J]. 中华消化杂志, 2017, 37 ( 6 ): 364-378. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2017.06.002.
- [ 10 ] Eghbali Z, Mojtahedi A, Moien AM, et al. Detection of 23S rRNA mutations strongly related to clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients in the north of Iran [J]. Jundishapur J Microbiol, 2016, 9 ( 2 ): e29694. DOI: 10.5812/jjm.29694.
- [ 11 ] Mori H, Suzuki H, Matsuzaki J, et al. Acquisition of double mutation in *gyrA* caused high resistance to sitafloxacin in *Helicobacter pylori* after unsuccessful eradication with sitafloxacin-containing regimens [J]. United European Gastroenterol J, 2017: 2050640617737215.
- [ 12 ] Binh TT, Shiota S, Suzuki R, et al. Discovery of novel mutations for clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* by using next-generation sequencing [J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69 ( 7 ): 1796-1803. DOI: 10.1093/jac/dku050.
- [ 13 ] Redondo JJ, Keller PM, Zbinden R, et al. A novel RT-PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mediated by mutations in the 23S rRNA gene [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2018, 90 ( 1 ): 1-6. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.014.
- [ 14 ] Lai CH, Huang JC, Chiang-Ni C, et al. Mixed infections of *Helicobacter pylori* isolated from patients with gastrointestinal diseases in Taiwan [J]. Gastroenterol Res Pract, 2016, 2016: 7521913. DOI: 10.1155/2016/7521913.

(收稿日期:2018-02-23)

(本文编辑:朱悦)

## 清洗刷清洗胃镜活检管道速度对胃镜清洗质量的影响

苏彬 姜丽华 姬云飞 卢晓静 冯晓静 吴建龙 刘有为 王俊奎 李建辉

胃镜是临床上检查消化道疾病的常用仪器,在临床工作中做好胃镜的清洗消毒工作是减少感染发生的必要措施。由于内镜在临床使用过程中的高周转率以及内镜自身结构的特殊性,常常导致生物膜的形成。生物膜通常是在反复使用和再使用过程中形成的,对外界环境有较强的抵抗力,当生物膜积累到一定厚度时,其中的细菌将很难被清除,最终引发感染<sup>[1]</sup>。因此,做好胃镜活检管道的清洗工作至关重要。本研究对比分析不同材质清洗刷和不同刷洗速度的清洗效果,旨在为提高胃镜活检管道的清洗效果提供一定参考。

### 一、材料与与方法

1.材料:塑料材质-海绵刷头清洗刷;钢丝材质-塑料刷头清洗刷;富士内镜;戊二醛消毒剂。

2.研究方法:纳入我院内镜室 2016 年 8 月至 2016 年 9

月收集的 160 条行胃镜活检后的 1.3 m 胃镜活检管道(均未清洗),患者在进行胃镜活检之前,均经乙肝、丙肝、结核、艾滋病以及梅毒等检查,且检查结果为阴性。将 160 条胃镜活检管道随机分为 A、B、C、D 4 组,每组 40 条,内镜管道清洗时,20 条选用塑料材质-海绵刷头清洗刷,20 条选用钢丝材质-塑料刷头清洗刷。A 组刷洗速度为 1.3 m/s,清洗时间为 1 s;B 组刷洗速度为 0.43 m/s,清洗时间为 3 s;C 组刷洗速度为 0.26 m/s,清洗时间为 5 s;D 组刷洗速度为 0.13 m/s,清洗时间为 10 s。4 组均经过 100 人次清洗后,对管道进行细菌采样,得出最佳清洗速度组。之后应用此清洗速度,分别应用塑料材质-海面刷头清洗刷和钢丝材质-塑料刷头清洗刷对自购的 2 条内镜活检管道进行 100 人次清洗,之后用外科剪纵向剖开活检管道,在显微镜下观察管道损害程度。

3.统计学方法:采用 SPSS 17.0 软件对结果统计分析,以  $\bar{x} \pm s$  表示计量资料,组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 二、结果

1.内镜活检管道清洗前后生物膜菌落计数比较:清洗之前,4 组内镜活检管道生物膜菌落计数比较,差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。采用不同刷洗速度清洗后,A 组生物膜菌落计数最多,与其他 3 组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ );C 组清洗后生物膜菌落计数最少,显著低于其他 3 组

DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-5232.2018.05.017

基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划(20160303)

作者单位:067000 河北省承德市中心医院消化内科内镜室(苏彬、姬云飞、卢晓静、冯晓静、李建辉),病理科(吴建龙),护理部(刘有为),科教科(王俊奎);承德医学院附属医院重症医学科(姜丽华)

通信作者:苏彬,Email: suerbao2008@sina.com