

DOI:10.13350/j.cjpb.240104

· 论著 ·

MTB39A 蛋白在昆虫细胞-杆状病毒系统中的表达与鉴定*

王璞, 黄月, 姜玲玲, 张刚, 蔡玉荣, 李勇**

(宁夏大学生命科学学院, 宁夏大学西部生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏银川 750021)

【摘要】 目的 旨在获得具有免疫原性的结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) MTB39A 蛋白。方法 选择 H37Rv 株中的 MTB39A(Rv1196)基因序列(GenBank ID:NC_000962.3)克隆至 pFastBac-Dual 载体 pH 启动子下游并进行鉴定。将鉴定正确的重组质粒转化入感受态细胞 DH10 Bac 中进行蓝白斑筛选, 获得的重组杆状质粒 Bacmid 利用脂质体转染至昆虫细胞 Sf9 中进行病毒拯救。转染后 96 h, 收取上清病毒液, 盲传 3 代后采用直接和间接免疫荧光法及 Western blot 检测 MTB39A 蛋白的表达。结果 重组质粒 pFastBac-dual-MTB39A-mCherry 和重组 Bacmid 构建正确, Western blot 检测显示 MTB39A 蛋白能被 His-tag 抗体识别, IFA 鉴定出现特异性红色荧光。结论 通过昆虫杆状病毒表达系统成功表达具有反应原性的 MTB39A 蛋白, 为新型结核疫苗候选物和潜在特异性诊断标志物的研制奠定了实验基础。

【关键词】 结核分枝杆菌; MTB39A 蛋白; 昆虫细胞-杆状病毒系统

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2024)01-0020-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 Jan;19(1):20-24.]

Expression and characterization of MTB39A protein in an insect cell-baculovirus system

WANG Pu, HUAN Yue, JIANG Lingling, ZHANG Gang, CAI Yurong, LI Yong (School of Life Science, Key lab of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western, Yinchuan 750021, China)

【Abstract】 **Objective** To obtain immunogenic *Mycobacterium tuberculosis* MTB39A protein. **Methods** The MTB39A (Rv1196) gene sequence (GenBank ID: NC_000962.3) from the H37Rv strain was selected to be cloned downstream of the pH promoter of the pFastBac-Dual vector and characterized. The correctly identified recombinant plasmid was transformed into receptor cell DH10 Bac for blue-white spot screening, and the obtained recombinant rod-shaped plasmid Bacmid was transfected into insect cell Sf9 for virus rescue using liposomes. At 96 h after transfection, supernatant viral solution was collected, and the expression of MTB39A protein was detected by direct and indirect immunofluorescence and Western blot after 3 generations of blind transmission. **Results** Recombinant plasmid pFastBac-dual-MTB39A-mCherry and recombinant Bacmid were constructed correctly, and Western blot assay showed that MTB39A protein could be recognized by His-tag antibody, and the IFA identification appeared specific red fluorescence. **Conclusion** Successful expression of the reactive MTB39A protein by an insect baculovirus expression system lays the experimental foundation for the development of novel tuberculosis vaccine candidates and potential specific diagnostic markers.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; MTB39A protein; Insect cells-baculovirus system

*** 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 是一种引起人兽共患传染性疾病——结核病 (tuberculosis, TB) 的病原体, 也是单一感染微生物导致死亡的重要原因。结核分枝杆菌主要有牛分枝杆菌 (牛型)、结核分枝杆菌 (人型) 和禽分枝杆菌 (禽型) 3 种。据 WHO 的 2022 年全球结核病报告, 全世界约 1/4 的人患有潜伏性结核感染 (LTBI), 每年新发病例约有 1000 万人, 死亡约 160 万人^[1], 感染者中有 5%~10% 会转化为活动性结核^[2], 而其中约 10% 的人类结核病由牛分枝杆菌引起^[3-4]。结核病在世界范围内

广泛流行, 危害极大, 疾病防控面临严峻挑战^[5]。

* **【基金项目】** 宁夏自然科学基金项目 (No. 2022AAC03084); 国家自然科学基金区域联合基金项目 (No. U22A20525); 宁夏回族自治区重点研发计划项目资助课题 (No. 2021BEF02028); 宁夏回族自治区重点研发计划项目资助课题 (东西部合作, No. 2017BN04)。

** **【通讯作者】** 李勇, E-mail: liyong7732@nxu.edu.cn

【作者简介】 王璞 (1997-), 女, 宁夏银川人, 博士研究生, 主要从事人兽共患病病原与发病机制的研究。
E-mail: wangpu1175@163.com

1998年结核分枝杆菌基因组测序已经全部完成^[6]。结核分枝杆菌基因组大约包含4 000个基因,其中存在一个特殊的基因家族——PE/PPE基因家族,约占MTB基因组编码区的10%,共编码168个蛋白^[6]。Dillon等^[7]从活动性结核疾病患者和接受过治疗的结核病患者血清中鉴定出一种新的来自结核分枝杆菌独有PE/PPE蛋白家族的T细胞抗原,并将其称为MTB39A蛋白(PPE18)^[8]。该蛋白全长1 176 bp,编码含有392个氨基酸,但关于该蛋白的功尚不清楚。本研究通过昆虫杆状病毒系统表达结核分枝杆菌MTB39A蛋白,并通过间接免疫荧光和Western blot对其进行反应原性鉴定,为MTB39A诊断检测和新型疫苗的研制奠定基础。

材料与方 法

1 材 料

1.1 载体、细胞 pFastBac-Dual载体和苜蓿银纹夜蛾细胞Sf9由本实验室保存。

1.2 主要试剂 核酸标志物购于天根生化科技有限公司;蛋白分子质量标准购于北京全式金有限公司;BamH I和Hind III限制性内切酶为NEB有限公司产品;胶红购于中国Biolife公司;TransIT[®]-LT1 Transfection Reagent购于美国Mirus公司;质粒提取试剂盒购于美国Axygen公司;鼠源His一抗购于中国abcam公司;HRP标记的山羊抗鼠购于中国proteintech公司;DAPI染液和SF-900无血清培养基购于美国Gibco公司;DH10 Bac感受态细胞购于中国博迈德生物技术有限公司。

2 方 法

2.1 目的基因的设计与合成 选择结核分枝杆菌H37Rv株MTB39A基因(GenBank ID:NC_000962.3),克隆至pFastBac-dual载体中的pH启动子下游。根据昆虫细胞-杆状病毒表达系统进行密码子优化,由南京金斯瑞有限公司进行基因合成,形成pFastBac-Dual-MTB39A-mCherry。

2.2 重组质粒的构建与鉴定 在pFastBac-Dual载体的pH启动子下游设计并构建目的序列,构建示意图如图1所示。用BamH I和Hind III对重组载体pFastBac-Dual-MTB39A-mCherry进行双酶切鉴定,鉴定正确后委托吉林库美生物科技有限公司测序。

2.3 重组Bacmid的获得及鉴定 将鉴定正确的重组质粒pFastBac-Dual-MTB39A-mCherry转入DH10 Bac感受态细胞中,以获得重组Bacmid转座子,混匀,冰浴30 min,42℃热激90 s,冰浴静置3 min,然后加入无抗的LB培养基,37℃220 r/min摇菌4 h以上。取菌液涂布至LB三抗平板(庆大霉素:7 μg/mL;四

环素:10 μg/mL;卡那霉素:50 μg/mL;X-gal:40 μg/mL;IPTG:40 μg/mL),利用蓝白斑筛选重组Bacmid,37℃恒温倒置培养48 h。挑取白斑进行扩大培养,用碧云天的杆状病毒穿梭载体Bacmid小量抽提试剂盒抽提Bacmid,采用M13通用引物对提取的Bacmid进行鉴定,引物序列见表1。

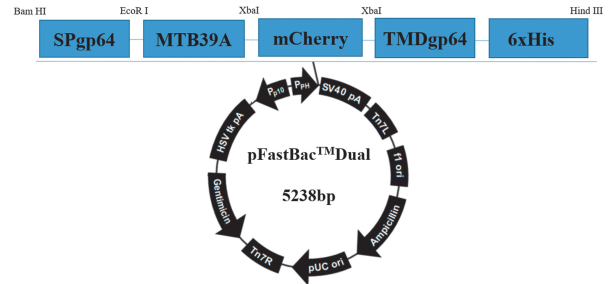


图1 荧光重组蛋白载体构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the construction of fluorescent recombinant protein vector

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')
M13-F	CCCAGTCACGACGTTGTTAAAACG
M13-R	AGCGGATAACAATTCACACAGG
MTB39A-F	TATTCATACCGTCCACC
MTB39A-R	AACAGACCGATTATCAAGC

2.4 重组杆状病毒的拯救 将 1×10^6 个生长良好的Sf9细胞铺入6孔细胞培养板中培养至细胞汇合率达70%~90%;加入一定量的Sf-900培养基,再加入5 μL转染试剂,轻轻混匀(切记不要涡旋)后室温静置5 min;加入1 μg Bacmid,室温静置孵育15~20 min;向预铺Sf9细胞的板孔中每孔均匀逐滴加入100 μL转染混合物,放入28℃细胞培养箱培养。收集细胞培养上清,即为转染后产生的P0代病毒,命名为rvAc-MTB39A-mCherry。

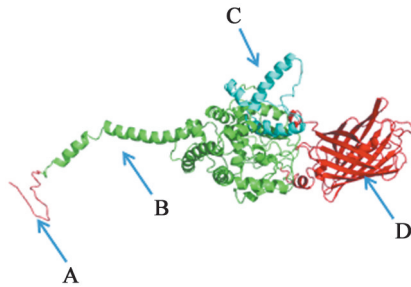
2.5 免疫荧光法检测MTB39A蛋白的表达 上述转染后的细胞分别于培养72、96和120 h后用倒置荧光显微镜在白光下观察细胞的形态变化,在蓝色激发光下观察荧光蛋白的表达情况。向预铺Sf9细胞的板孔中按MOI=0.1逐滴加入重组杆状病毒rvAc-MTB39A-mCherry,27℃培养96 h,弃掉培养基;加入500 μL 4%多聚甲醛,固定10 min;用0.2% Triton X-100进行透膜处理,孵育10 min,PBST洗涤3次,每次5 min;加入5% BSA的封闭液,室温封闭1 h;加入用封闭液按1:500体积稀释的鼠源抗His单抗,4℃过夜避光孵育,PBST洗涤;加入500 μL按体积比1:500稀释的CoraLite488标记羊抗鼠IgG,PBST洗涤;加入500 μL DAPI进行染核,染色后的细胞置于载玻片上用倒置显微镜下进行观察。

2.6 Western blot 检测 MTB39A 蛋白的表达 收集感染 rvAc-MTB39A-mCherry 的 Sf9 细胞进行破碎处理,14 000 r/min(离心半径 7.8 cm)离心 5 min,收集上清,制备蛋白样品,经 SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜上,以 Anti-6×His tag 为一抗,山羊抗鼠 IgG 为二抗进行 Western blot,检测 MTB39A 蛋白的表达情况。

结 果

1 目的基因序列设计与荧光重组蛋白载体的构建

选择结核分枝杆菌 H37Rv 株(GenBank ID:NC_000962.3)MTB39A 基因优化序列,并携带 mCherry 红色荧光蛋白,末端加入 6×His 标签基因用于蛋白鉴定。目的基因与载体构建示意图如图 1 所示,使用 I-TASSER 在线服务器对 MTB39A 蛋白进行三维结构模拟,模拟如图 2 所示,由于 C-score 和 TM-score 之间的高度相关性,该模型被选为最佳模型。



A SP 信号肽 B MTB39A 蛋白 C TMD 结构域 D mCherry 荧光蛋白。

图 2 MTB39A 蛋白三维结构模拟图

A SP signaling peptide B MTB39A protein C TMD structural domain D mCherry fluorescent protein.

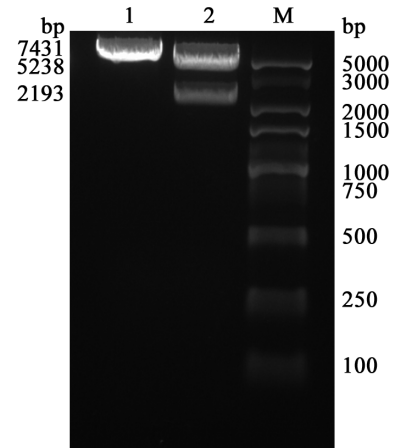
Fig. 2 3D structure simulation of MTB39A protein

2 重组质粒 pFastBac-Dual-MTB39A-mCherry 的鉴定

重组质粒 pFastBac-Dual-MTB39A-mCherry 用 BamH I 和 Hind III 进行双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳检测显示酶切片段大小与预期相符(载体片段 5 238 bp,MTB39A 基因片段 2 193 bp)(图 3)。将重组质粒 pFastBac-Dual-MTB39A-mCherry 转化入大肠埃希菌 TOP10 感受态细胞后涂平板,37 °C 倒置培养 12~14 h 后挑取单菌落,用 MTB39A 引物进行菌落 PCR 鉴定,结果如图 4 所示,目的基因片段大小与预期相符。

3 重组杆粒 Bacmid 的鉴定

将重组质粒转入 DH10 Bac 感受态细胞中,对鉴定正确的菌落摇菌培养,提取杆粒 Bacmid 后进行 PCR 鉴定,结果如图 5 所示,扩增的目的基因片段大小与预期相符。

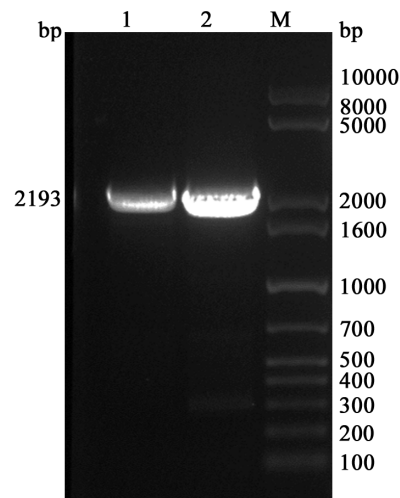


M DNA 标志物(DL5000) 1 pFastBac-Dual-MTB39A-mCherry BamH I 单酶切 2 pFastBac-Dual-MTB39A-mCherry BamH I 和 Hind III 双酶切

图 3 重组质粒 pFastBac-Dual-MTB39A-mCherry 酶切鉴定

M DNA marker (DL5000) 1 pFastBac-Dual-MTB39A-mCherry BamH I single digestion 2 pFastBac-Dual-MTB39A-mCherry BamH I and Hind III double digestion

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pFastBac-Dual-MTB39A-mCherry double digestion



M DNA 标志物(1kb plus) 1,2 菌落 PCR 扩增目的基因产物

图 4 重组质粒菌落 PCR 鉴定

M DNA marker (1 kb plus) 1,2 Colony PCR amplification of target gene products

Fig. 4 PCR identification of recombinant plasmid colonies

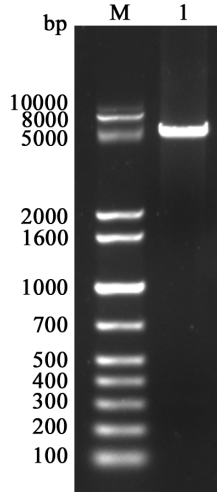
4 重组杆状病毒 rvAc-MTB39A-mCherry 的获得

鉴定正确的重组 Bacmid 转染 Sf9 细胞 120 h 后,Sf9 细胞均出现体积膨胀、细胞核体积增大、颜色加深、细胞表面凹凸不平明显病变标志(图 6),而正常细胞无上述变化。通过直接免疫荧光试验观察,有红色荧光蛋白表达(图 7),重组杆状病毒 rvAc-MTB39A-mCherry 拯救成功。

5 IFA 鉴定 MTB39A 蛋白的表达

为进一步验证目的蛋白在 Sf9 细胞内的定位情况,对野生型病毒和重组杆状病毒感染 96 h 后的 Sf9

细胞进行间接免疫荧光试验,结果如图8。感染 rvAc-MTB39A-mCherry 和野生型病毒的细胞核均呈现蓝色荧光,都可被 DAPI 染色,而只有感染 rvAc-MTB39A-mCherry 的细胞能产生绿色荧光信号,证明被重组病毒 rvAc-MTB39A-mCherry 感染的细胞表达的蛋白能够成功定位在细胞膜表面。



M DNA 标志物(1kb plus) 1 重组 Bacmid PCR 产物

图 5 重组 Bacmid PCR 鉴定

M DNA marker (1kb plus) 1 Recombinant Bacmid PCR product

Fig. 5 Recombinant Bacmid PCR identification map

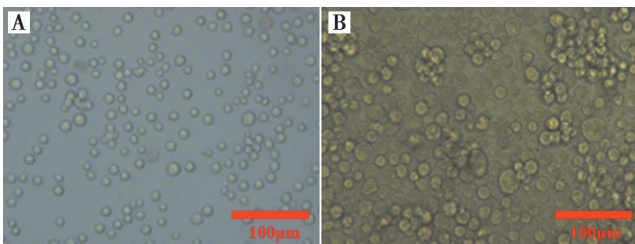


图 6 正常 Sf9 细胞(A)与病变 Sf9 细胞(B)

Fig. 6 Normal cells(A) and diseased cells(B)

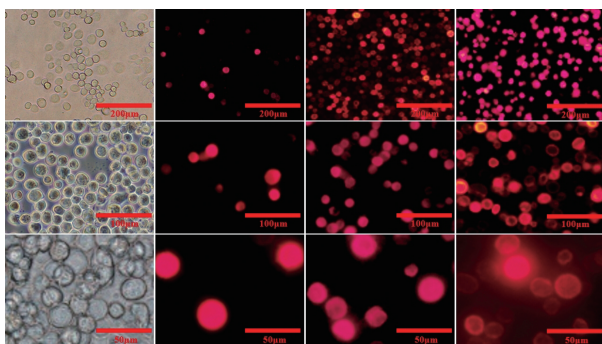


图 7 荧光重组 Bacmid 转染的 Sf9 细胞

Fig. 7 Fluorescent recombinant Bacmid transfected with Sf9 cells

6 重组蛋白 MTB39A 的 Western blot 鉴定

收集感染 rvAc-MTB39A-mCherry 的 Sf9 细胞,裂解破碎后进行 SDS-PAGE 电泳,泳毕后转膜,以

Anti-6×His-tag 作为一抗进行 Western blot,结果如图9。目的蛋白能被相应抗体识别,反应条带位于 77ku 处,表明表达的 MTB39A 蛋白具有反应原性。

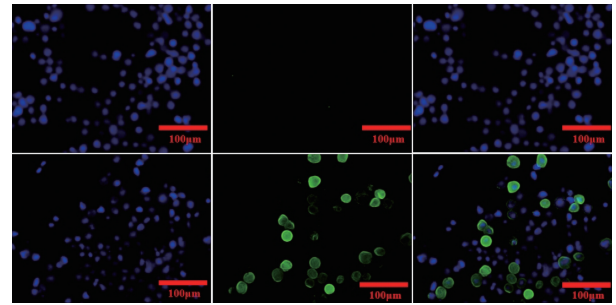
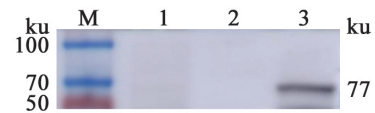


图 8 野生型病毒和重组杆状病毒感染的 Sf9 细胞间接免疫荧光检测

Fig. 8 Indirect immunofluorescence of wild-type virus and recombinant baculovirus-infected Sf9 cells



M 蛋白分子质量标准 1 空白对照 2 阴性对照 3 重组 MTB39 A 蛋白与相应抗体反应条带

图 9 重组蛋白 MTB39A 的 Western-blot 鉴定

M Protein molecular quality standard 1 Blank control 2 Negative control 3 Bands of recombinant MTB39 A protein reacting with the corresponding antibody

Fig. 9 Western-blot identification of recombinant protein MTB39A

讨论

MTB39A 蛋白是结核分枝杆菌特有的保守蛋白家族 PE/PPE 中的重要一员,也是影响宿主的 Th1 和 Th2 型免疫应答平衡的重要毒力因子^[9-10],其 N-末端结构域可劫持宿主富含亮氨酸重复序列 TLR2 的 (LRR) 11-15 区并与其结合^[8],激活 p38MAPK-SOCS3-NF-κB/c-rel 细胞信号通路^[11]。该蛋白还通过参与下调 NO 和 I 型干扰素的产生^[12-13]、阻断巨噬细胞对 IFN-γ 的响应等多种途径阻碍巨噬细胞中抗原的降解,导致宿主激活适应性免疫反应能力下降。故对 MTB39A 蛋白进行结构预测有利于深入了解结核分枝杆菌的特性,为结核病的检测和疫苗研制提供理论依据。

昆虫细胞-杆状病毒系统是一种理想的真核表达系统,具有基因容量大、安全性高、高效表达外源蛋白的能力及翻译后加工修饰功能,可保持外源蛋白天然构造与免疫活性^[14-16]。用该表达系统表达的重组牛 IFN-γ 蛋白^[17]、猫传染性腹膜炎病毒 N 蛋白^[18]、蓝舌病毒血清 8 型 NS3 蛋白^[19]均具有良好的免疫原性和反应原性。以上表明该系统可高效表达外源蛋白。此外,杆状病毒有专一的无脊椎动物寄主,不会感染哺乳动物,这一特点使得经过体外培养得到的重组蛋白用于药物研发和疫苗生产安全性高。

本实验利用昆虫杆状病毒系统表达发 MTB39A 蛋白,经鉴定该蛋白具有反应原性,为研制可用于初期感染结核诊断试剂或新型结核疫苗奠定了一定的理论与实践基础。

【参考文献】

[1] WHO. Global tuberculosis report [R]. Geneva: World Health Organization, 2022.

[2] Yang J, Lee S, Oh S, et al. The risk of active tuberculosis among individuals living in tuberculosis-affected households in the Republic of Korea, 2015[J]. PLoS One, 2019, 14(12): e0225744.

[3] Salvador LCM, O'Brien DJ, Cosgrove MK, et al. Disease management at the wildlife-livestock interface: Using whole-genome sequencing to study the role of elk in *Mycobacterium bovis* transmission in Michigan, USA[J]. Mol Ecol, 2019, 28(9): 2192-2205.

[4] Palmer MV, Wiarda J, Kanipe C, et al. Early Pulmonary Lesions in Cattle Infected via Aerosolized *Mycobacterium bovis* [J]. Vet Pathol, 2019, 56(4): 544-554.

[5] Chakaya J, Khan M, Ntoumi F, et al. Global Tuberculosis Report 2020-Reflections on the Global TB burden, treatment and prevention efforts[J]. Int J Infect Dis, 2021, 113(Suppl 1): S7-S12.

[6] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence [J]. Nature, 1998, 393(6685): 537-544.

[7] Dillon DC, Alderson MR, Day CH, et al. Molecular characterization and human T-cell responses to a member of a novel *Mycobacterium tuberculosis* mtb39 gene family[J]. Infect Immun, 1999, 67(6): 2941-2950.

[8] Nair S, Pandey AD, Mukhopadhyay S. The PPE18 protein of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits NF-kappaB/rel-mediated proinflammatory cytokine production by upregulating and phosphorylating suppressor of cytokine signaling 3 protein[J]. J

Immunol, 2011, 186(9): 5413-5424.

[9] Bhat KH, Ahmed A, Kumar S, et al. Role of PPE18 protein in intracellular survival and pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* in mice[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52601.

[10] Dolasia K, Nazar F, Mukhopadhyay S. *Mycobacterium tuberculosis* PPE18 protein inhibits MHC class II antigen presentation and B cell response in mice[J]. Eur J Immunol, 2021, 51(3): 603-619.

[11] Nair S, Ramaswamy P A, Ghosh S, et al. The PPE18 of *Mycobacterium tuberculosis* interacts with TLR2 and activates IL-10 induction in macrophage [J]. J Immunol, 2009, 183(10): 6269-6281.

[12] Queval CJ, Song OR, Deboosere N, et al. STAT3 represses nitric oxide synthesis in human macrophages upon *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. Sci Rep, 2016, 6: 29297.

[13] 姚志鸿, 张志芳, 胡苏洁, 等. 结核分枝杆菌诱导宿主 I 型干扰素应答及其免疫调控功能研究进展[J]. 生物学杂志, 2022, 39(4): 94-97.

[14] Contreras-Gomez A, Sanchez-Miron A, Garcia-Camacho F, et al. Protein production using the baculovirus-insect cell expression system[J]. Biotechnol Prog, 2014, 30(1): 1-18.

[15] Salem TZ, Cheng XH, Cheng XW. AcMNPV enhances infection by ThorNPV in Sf21 cells and SeMNPV in Hi5 cells[J]. Arch Virol, 2012, 157(10): 1875-1885.

[16] Muralidharan A, Russell M, Larocque L, et al. Targeting CD40 enhances antibody- and CD8-mediated protection against respiratory syncytial virus infection[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 16648.

[17] 王睿男, 蒋菲, 刘亚涛, 等. 重组牛 IFN-γ 蛋白在昆虫杆状病毒表达系统中的表达、纯化和鉴定[J]. 中国草食动物科学, 2021, 41(2): 39-43.

[18] 李双星, 刘业兵, 柳方远, 等. 猫传染性腹膜炎病毒 N 蛋白在昆虫细胞-杆状病毒系统中的表达与鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(1): 273-279.

[19] 黄超华, 曹琛福, 阮周曦, 等. 蓝舌病病毒血清 8 型 NS3 蛋白在昆虫杆状病毒系统中的表达与鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(04): 1-4, 10, 141.

【收稿日期】 2023-08-30 【修回日期】 2023-11-15

(上接 19 页)

【参考文献】

[1] 马丹娟, 黄研, 卢春敏, 等. 2016-2018 年某医院产超广谱 β-内酰胺酶肺炎克雷伯菌的临床分布及耐药性分析[J]. 国际医药卫生导报, 2020, 26(12): 1672-1675.

[2] Hutchison ML, Walters LD, Moore A, et al. Effect of length of time before incorporation on survival of pathogenic bacteria present in livestock wastes applied to agricultural soil [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(9): 5111-5118.

[3] 何珊珊, 陈敏, 金海英. 肺炎克雷伯菌临床分布特点与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 19(2): 4345-4346.

[4] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular typing working group of the society for healthcare epidemiology of america[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 1997, 18(6): 426-439.

[5] 庞慧, 弓艳娥, 袁敏, 等. 山西省某医院发现的携带碳青霉烯酶基因的肺炎克雷伯菌的流行特征研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(11): 1110-1115.

[6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards

for antimicrobial susceptibility testing [S]. Twenty-first Informational Supplement, 2011, M100-S21.

[7] 周蓉, 朱卫民, 黄文祥, 等. 855 株肺炎克雷伯菌感染的临床分布及耐药性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(5): 363-369.

[8] 张帆. 肺炎克雷伯菌医院感染及耐药性分析[J]. 医学检验与临床, 2021, 32(1): 30-33.

[9] 孙长贵, 李振江, 曾贤铭, 等. 肺炎克雷伯菌医院感染监测及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(6): 737-739.

[10] 季淑娟, 顾怡明, 谭文涛, 等. 中国部分地区大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌超广谱 β-内酰胺酶基因研究[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(9): 590-593.

[11] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2016 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(5): 481-491.

[12] 陈夏容, 黄丹丹, 林丽玲. 肺炎克雷伯杆菌致医院感染和社区感染的耐药性研究[J]. 海峡预防医学杂志, 2019, 25(4): 57-60.

[13] 刘保光, 吴华, 张萍英. 肺炎克雷伯菌耐药研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2014, 46(2): 108-111.

[14] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2017 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(3): 241-251.

【收稿日期】 2023-07-29 【修回日期】 2023-10-16