

UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL
Facultad de Ciencias Naturales y Matemática
Departamento Académico de Biología

***“ANÁLISIS DE SECUENCIAS DEL PLÁSMIDO pVA1 Y SU RELACIÓN CON LA
PATOGENICIDAD DE LA ENFERMEDAD AGUDA DE LA NECROSIS DEL
HEPATOPÁNCREAS EN LANGOSTINOS DE TUMBES”***

Informe Final de Investigación

Profesor Responsable: Mag. RAMSES SALAS ASENCIOS - P.ASOC. T.C.

Profesor Miembro: Dr. FREDY V. SALINAS MELENDEZ – P.PRINC. T.C.

Profesor Miembro: Mag. MARÍA ELENA RODRIGO ROJAS – P.AUX. T.P.

Alumna Miembro: Sr. ÍTALO LAZABARA HUAMÁN

Colaborador Externo: Blgo. RODOLFO Z. VELAZCO PEÑA

Lima, 2022

Título: Análisis de Secuencias del plásmido pVA1 y su relación con la patogenicidad de la Enfermedad Aguda de la Necrosis del Hepatopáncreas en langostinos de Tumbes.

Autores: Mag. Blgo. Ramsés Salas Asencios (P.ASOC. T.C.), Dr. Fredy V. Salinas Melendez (P.PRINC. T.C.), Mag. María Elena Rodrigo Rojas (P.AUX.T.P), Blgo. Rodolfo Zenaido Velazco Peña, (Laboratorio de Sanidad Acuícola de Tumbes, SANIPES), Sr. Ítalo Lazabara Huamán (Estudiante participante).

Asistente técnico de laboratorio: Lic. Rosa Inés Aguirre Romero.

UIIE: Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática.

Línea De Investigación (Resolución R. N° 2821-2018-CU-UNFV): 02. Genética, Bioquímica y Biotecnología, Área de Ciencias Básicas.

Línea de Investigación: Genética, Bioquímica y Biotecnología; Área de Ciencias Básicas.

RESUMEN

Se aislaron cepas de *Vibrio* de langostinos provenientes de los estuarios de Tumbes afectados por la enfermedad aguda de la necrosis del hepatopáncreas (AHPND), de las cuales se obtuvieron plásmidos positivos para la toxina PirA-B, factor principal asociado al desarrollo de la AHPND. Se secuenciaron cuatro de estos plásmidos, observándose que presentaban una mayor similitud entre ellos y con una secuencia accesada en el GenBank. Sólo un plásmido de Tumbes presentó mayor divergencia con la secuencia de referencia. Estos resultados permiten suponer que la gran variabilidad obtenida podría estar relacionada a transferencia horizontal, incluso entre diferentes plásmidos.

Palabras clave: AHPND, plásmidos, *Vibrio*.

ABSTRACT

Vibrio strains were isolated from shrimps of Tumbes estuaries affected by Acute Hepatopancreas Necrosis Disease (AHPND). From these strains, PirA-B positive plasmids were obtained. Four of these plasmids were sequenced, and results showed a greater similarity between them than respect to the sequences obtained from GenBank. Only one plasmid of Tumbes showed greater divergency with the reference sequence. Results allow to assume there is a great genetic variability in plasmids containing gene PirA_B.

Key words: AHPND, *Vibrio*, plasmids.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de langostinos se ha vuelto una actividad económica muy importante en el norte de nuestro país, por lo que merece una vigilancia respecto a la prevalencia de enfermedades que puedan disminuir la productividad. Dentro de estas, la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND) genera una tasa de mortalidad que llegó hasta el 100% entre el 2009 y el 2011 en zonas del sudeste de Asia (Varela et al., 2017), mientras que en México la mortalidad alcanzó un valor de 65% el 2013 (Varela y Peña, 2014). Sin embargo, en el norte del Perú la patogenicidad no ha sido alta (Velazco et al., 2022). La explicación de esto podría ser que, en las poblaciones de langostinos de América Latina se genera una fase crónica de AHPND, lo que podría generar estas mortalidades menores a comparación de las que se observan en el Sureste de Asia (Aranguren et al., 2020).

Por otro lado, Han et al. (2015) identificaron un plásmido de 69 kb (al que llamaron pVPA3-1) en cepas de *V. parahaemolyticus* que causaban AHPND. El secuenciamiento del

plásmido mostró la presencia de 92 marcos de lectura (ORF por sus siglas en inglés), que codificaban además de proteínas de movilidad, enzimas de replicación, transposasas y de proteínas de virulencia, los genes para una toxina binaria similar a la que produce la bacteria *Photorhabdus*, un comensal de nemátodos entomopatógenos, por lo que la toxina fue llamada Pir y los dos genes asociados, pirA y pirB.

Lee et al. (2015) demostraron que este plásmido, de 69-70 Kb puede transmitirse de una bacteria del género *Vibrio* productora de AHPND a otra que no genera esta enfermedad y volverla virulenta, productora del daño al hepatopáncreas. Este resultado implicaba la posibilidad de que los genes para esta toxina puedan haber sido distribuidas de manera horizontal entre diversas especies de este género, quizá asociándose a transposones (Xiao et al., 2017). Esto podría explicar por qué en la actualidad se han detectado genes PirA-B en diferentes plásmidos presentes en cepas de *Vibrio* y que poseen diferente contenido y tamaño.

El objetivo del presente trabajo es determinar la relación entre la secuencia nucleotídica del plásmido pVA1 y la patogenicidad de la Enfermedad Aguda de la Necrosis del Hepatopáncreas en langostinos de Tumbes.

MÉTODO

Procedimiento

Obtención de Muestras

Las muestras de langostinos afectados por el síndrome de necrosis aguda del hepatopáncreas fueron colectadas en los estuarios cercanos a granjas langostineras de la localidad de Tumbes, observándose su sintomatología. Se procedió a tomar muestras del hepatopáncreas de los animales afectados, colocándolos en una solución de alcohol 50% como preservante. Por otro lado, se realizó un hisopado de la superficie de los langostinos afectados y se tomaron muestras de 100 c.c. de agua de mar cercanos al litoral y en regiones aledañas a las granjas langostineras en las que se detectaron especímenes afectados. Los hisopos utilizados fueron colocados en tubos estériles que contenían 15 ml de agua peptonada alcalina. De todas estas muestras se tomaron alícuotas de 5 mL para realizar un sembrado por diseminación utilizando espátulas de Drigalsky, en placas Petri que contenían Agar Tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa (TCBS, Merck) como medio selectivo específico para el género *Vibrio*. Las placas fueron mantenidas en incubación a 37°C y se realizaron lecturas a las 24 y 48 horas.

Identificación de cepas de Vibrio generadoras de AHPND

Las colonias positivas al medio selectivo y positivas para *Vibrio* según la morfología microscópica y la coloración Gram, fueron resuspendidas en solución salina estéril y centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos. Luego se realizó un segundo lavado y finalmente se resuspendió en buffer TE 1X a pH 8.0. Se realizó una incubación a 90°C por 10 minutos e inmediatamente se trasladaron estas muestras a -20°C por 5 minutos. Luego, se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto, y el sobrenadante fue almacenado a -50°C hasta su utilización posterior. Se procedió a identificar las muestras positivas al gen PirA-B mediante PCR según Velazco et al. (2022). Se aislaron plásmidos de las cepas del género *Vibrio* positivas al gen PirA-B mediante el kit **High Pure Plasmid Isolation Kit** (Roche), visualizando la presencia del plásmido mediante electroforesis.

Secuenciamiento del plásmido.

Se seleccionaron cinco muestras de los plásmidos positivos para PirA-B para ser enviados a secuenciamiento mediante el sistema MinION Mk1C (Nanopore Inc.), a través de la empresa Umbrella Genomics S.A. Paralelamente, se buscaron secuencias de plásmidos PirA-B positivas en la base de datos de GenBank del National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Todas las secuencias en formato FASTA fueron analizadas mediante alineamiento múltiple utilizando el programa Clustal Omega a través del servidor del European Molecular Biology Laboratory (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Las secuencias alineadas fueron luego analizadas mediante el programa MEGA11 (Tamura, Stecher y Kumar, 2021) para calcular las distancias genéticas, y finalmente se usó el programa PhyML a través del servidor del Montpellier Bioinformatics Platform (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) para generar un filograma para mostrar las cercanías filogenéticas de estos plásmidos.

RESULTADOS

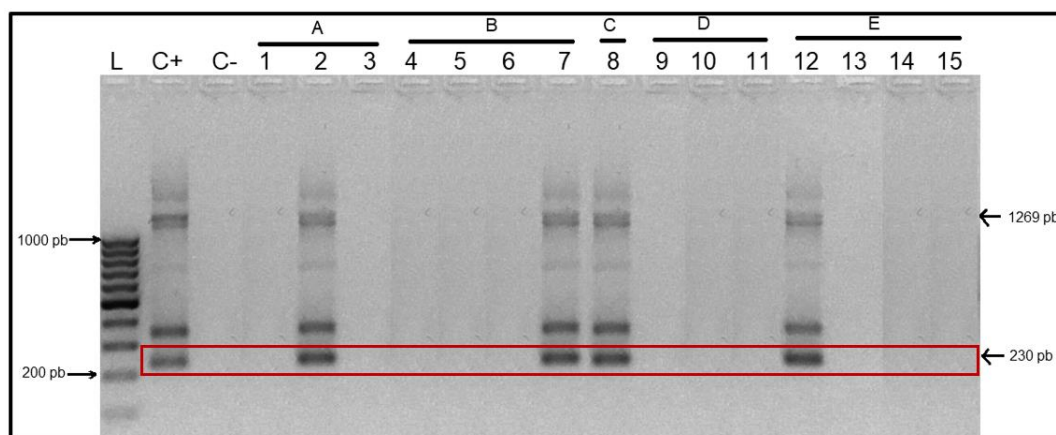
Identificación de los Genes *pirA* y *pirB*

Se procedió a la amplificación por Nested PCR según Velazco et al. (2022) utilizando cebadores para los genes de las proteínas *pirA* y *pirB* (Figura 1), logrando la amplificación del fragmento de 1269 pb y sobre todo el de 230 pb, lo cual permite la identificación de cepas PirA-B positivas. Como resultado de esto, se identificaron 12 cepas aisladas de *Vibrio* infectando a langostinos en

los estuarios de Tumbes, cuyas muestras de ADN están sirviendo para el análisis de secuenciación de plásmidos.

Figura 1.

Ejemplo de Nested PCR pirA-B. Las bandas 2, 7, 8 y 12 corresponden a cepas positivas para los genes de la toxina binaria PirA-B provenientes de granjas acuícolas A, B, C y E, respectivamente. El área de la banda de 230 pb se ha resaltado con un rectángulo de color rojo. Tomado de Velazco et al. (2022)



Análisis de alineamiento múltiple

Se analizaron 13 secuencias mediante el programa Clustal Omega, 4 de las cuales fueron de los plásmidos aislados de los langostinos afectados por AHPND en Tumbes (Tabla 1).

Tabla 1.

Secuencias analizadas en el presente trabajo. Los que han sido marcados con un asterisco son las muestras de plásmidos provenientes de las cepas aisladas en Tumbes.

Código de Secuencia	Tamaño (pb)
NZ_CP065372	67093

CP065372	67093
AP014860	69078
KM067908	69168
CP020036	69227
KP324996	70452
CP097860	77278
NZ_KP324996	70452
CP083364	67089
B1E_PLASMID*	78471
A31C_PLASMID*	73283
A3B_PLASMID*	74118
B1A_PLASMID*	37709

El análisis de alineamiento múltiple mediante el programa Clustal Omega también permitió identificar que los plásmidos utilizados presentaban una gran variabilidad en cuanto a su secuencia nucleotídica, la cual se puede demostrar al calcular las distancias genéticas (Tabla 2), observándose que los plásmidos obtenidos de las cepas de *Vibrio* aisladas en Tumbes, sólo se encontraban con menor distancia entre sí y con la secuencia del plásmido de accesión CP097860 en el Genbank, con solo la excepción del plásmido A3B, con la que se puede observar una distancia relativamente mayor.

Tabla 2.

Matriz de distancias genéticas de los plásmidos analizado. En color gris se muestran las distancias genéticas entre los plásmidos provenientes de Tumbes, en color azul se muestra las distancias genéticas entre estos plásmidos con la accesión CP097860 del GenBank, y en color verde con las de otras tres accesiones.

	CP065372	NZ_ CP065372	AP014860	KM067908	CP020036	B1E_ PLASMID	A31C_ PLASMID	A3B- PLASMID	OB1A_ PLASMID	CP097860	KP324996	NZ_ KP324996
CP065372												
NZ_CP065372	0.000000											
AP014860	0.044258	0.044258										
KM067908	0.053748	0.053748	0.019996									
CP020036	0.044198	0.044198	0.000279	0.019832								
B1E_PLASMID	4.633039	4.633039	4.624457	4.299378	4.632856							
A31C_PLASMID	4.559811	4.559811	4.578700	4.247131	4.586147	0.008227						
A3B-PLASMID	4.265144	4.265144	4.296798	3.857295	4.296218	0.000096	0.000147					
B1A_PLASMID	4.169113	4.169113	4.243249	3.724478	4.256210	0.000085	0.000170	0.000064				

CP097860	4.169605	4.169605	4.234551	3.754334	4.245985	0.000070	0.000026	0.029798	0.000071			
KP324996	4.519685	4.519685	4.596273	4.690814	4.604474	0.027897	0.028172	0.028966	0.031065	0.028205		
NZ_KP324996	4.519685	4.519685	4.596273	4.690814	4.604474	0.027897	0.028172	0.028966	0.031065	0.028205	0.000000	
CP083364	4.622752	4.622752	4.616766	4.584102	4.625146	0.038219	0.037100	0.021052	0.007465	0.020628	0.050458	0.050458

Es interesante señalar también en la Tabla 2 una distancia relativamente cercana con otras tres secuencias accedidas en el GenBank, todas provenientes de Asia (Tabla 3).

Tabla 3.

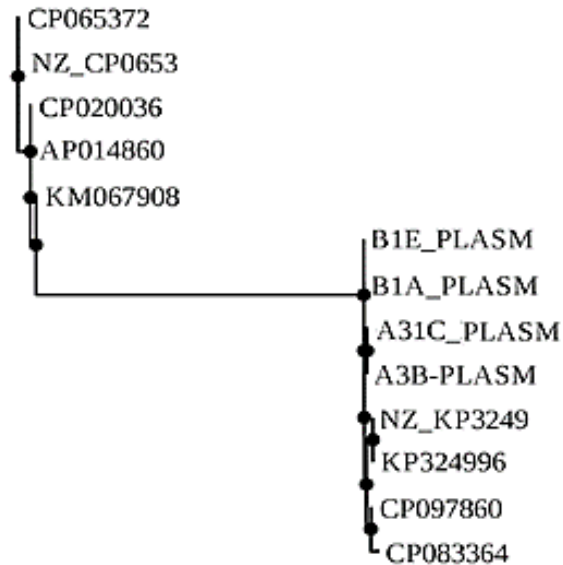
Origen y microorganismo del que provienen las accesiones con menor distancia respecto a las secuencias de los plásmidos aislados de Tumbes.

Código GenBank	Microorganismo	Procedencia
K324996	<i>V. parahaemolyticus</i>	Tailandia, Vietnam
NZK324996	<i>V. parahaemolyticus</i>	Tailandia, Vietnam
CP097860	<i>V. owensii</i>	China
CP083364	<i>V. parahaemolyticus</i>	Corea del Sur

Estos resultados son corroborados cuando se construye un árbol tipo filograma (Figura 2), en el cual se puede observar que los cuatro plásmidos obtenidos de cepas de *Vibrio* en los estuarios de Tumbes presentan una mayor cercanía a 4 secuencias de plásmidos provenientes del Genbank.

Figura 2.

Filograma de las secuencias de plásmidos utilizadas. Se muestra parte del código de acceso del GenBank y las secuencias de plásmidos aislados en Tumbes presentan la terminación “PLASM”.



DISCUSIÓN

Habiendo referencias que indican que posiblemente se requieran la presencia de otros factores a la toxina PirA-B para generar la enfermedad aguda de la necrosis del hepatopáncreas (AHPND), es importante analizar las secuencias nucleotídicas del plásmido pVA1 que alberga la toxina en cepas de *Vibrio sp.* que infectan los cultivos langostineros de Tumbes y que también podrían estar asociadas al desarrollo de la AHPND. Se ha mostrado que existe la posibilidad de transferencia horizontal intra e interespecífica de este plásmido, lo que podría hacer posible la generación de mayor variación nucleotídica asociada a una mayor mortalidad en langostinos en nuestra región, tomando en cuenta que hasta ahora no hay muerte masiva en las zonas langostineras de Perú y Ecuador (Aranguren et al., 2020). Dong et al. (2019) demostraron que plásmidos del tipo pVA1, que llevan los genes para la toxina binaria PirA-B, pueden ser transferidos de cepas poseedoras causantes de AHPND a bacterias no patogénicas, a través de mecanismos conjugativos. Esta transferencia horizontal de plásmidos se vería facilitada entre bacterias estrechamente

relacionadas, como las halofílicas *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii* y *V. owensii* quienes, incluso, colonizan los mismos nichos marinos (Liu et al., 2018). De igual forma, Muthukrishnan et al. (2019) detectaron transferencia horizontal genética horizontal de genes PirA-B desde cepas de *V. parahaemolyticus* positivas para AHPND a cepas no productoras de la enfermedad e incluso a especies de géneros diferentes como *Algoriphagus* sp.

Ramirez et al. (2020) aislaron cinco cepas de *Vibrio parahaemolyticus* positivas por PCR a los genes PirA-B, de las cuales dos cepas produjeron mortalidad y daños histológicos concordantes con la AHPND, pero otras dos no eran patogénicas pese a tener también los genes para la toxina. Esto sugiere que, pese a tener los genes para la toxina binaria PirA-B, deben existir otros factores adicionales que intervienen en la generación de la enfermedad. Por lo expuesto, es válido cuestionar si existe una variabilidad nucleotídica en la secuencia de los genes para la toxina PirA-B o si son otros factores genéticos que podrían estar presentes en el plásmido y que también modularían la generación de la enfermedad de la AHPND. Al respecto, se puede resaltar el trabajo de Ahmed et al. (2022) quienes señalaron que, además del gen para la toxina binaria PirA-B, el plásmido adquiere algunos factores de virulencia relacionados directamente a la patogenicidad.

Estos datos muestran la importancia de evaluar la secuencia nucleotídica del plásmido pVA1, que alberga la toxina binaria PirA-B, con el fin de verificar si existen otros genes adicionales que puedan asociarse a la patogenicidad de la AHPND. En el presente trabajo se aislaron plásmidos de cepas de *Vibrio* asociadas a infección de langostinos de los estuarios de Tumbes que desarrollaron AHPND, seis de los cuales se enviaron a secuenciar. El resultado del secuenciamiento mostró que dos de estos plásmidos tenían entre 130 y 146 kpb, tres tenían una longitud entre 73 y 78 kpb, lo cual está más cercano a la longitud descrita del plásmido PVA1 (Lee et al., 2015). Sin embargo, cuando se revisaron secuencias de plásmidos positivos para genes

PirA-B, se encontraron también plásmidos con entre 103.98 y 129.87 kpb. Estas observaciones corroboran que los genes tipo PirA-B y quizá otros factores asociados también a la generación de AHPND se encuentran en diferentes tipos de plásmidos, quizá obtenidos por transferencia horizontal.

De todos los plásmidos obtenidos, el presente trabajo utilizó trece (Tabla 1), aquellos cuya secuencia estaba cercana a los 69-71 kpb. La Tabla 2 muestra que los plásmidos aislados en Tumbes presentaban una distancia genética más cercana a 4 de las nueve accesiones obtenidas del GenBank, de las cuales la menor distancia era con el plásmido de accesión CP097860, proveniente de China (Tabla 3). El filograma de la Figura 2 corrobora esta cercanía, pero permite mostrar también que el plásmido de Tumbes de acceso A3B-PLASMID es el único que no está demasiado cerca al plásmido de referencia, pero pertenece al grupo asociado filogenéticamente. Sin embargo, se debe recordar que, pese a estas diferencias, todas las secuencias utilizadas provienen de cepas bacterianas generadoras de AHPND, lo que implica que el siguiente paso del presente trabajo es identificar la información genética común en todas las secuencias plasmídicas, las cuales muy probablemente tengan relación con la generación o el desarrollo de la AHPND.

CONCLUSIONES

Se lograron aislar cerca de las zonas langostineras de Tumbes cepas de *Vibrio sp.* asociadas a la enfermedad aguda de la necrosis del hepatopáncreas, siendo positivas en contener los genes para la toxina PirAB detectados mediante PCR.

Se extrajeron plásmidos de las cepas PirA-B positivas a AHPND, y el secuenciamiento permite observar una gran variabilidad de secuencias, lo que implica que son varios tipos de plásmidos presentes en bacterias positivas para los genes pAV1, lo que hace suponer que podrían tener más de un factor relacionado al desarrollo de la AHPND.

RECOMENDACIONES

Como se tiene la secuencia completa de nucleótidos de estos plásmidos, el siguiente paso será analizar el contenido de genes que contengan, para identificar posibles factores de desarrollo de la AHPND, sea presencia de transposones, genes de transferencia horizontal, etc.

Es importante considerar en una futura etapa de este tipo de investigaciones si a nivel genético, los langostinos presentan también factores de control de la evolución de la enfermedad en los langostinos de Tumbes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, J., Khan, M.H., Unnikrishnan, S., y Ramalingam, K. (2021). Acute Hepatopancreases Necrosis Diseases (AHPND) as Challenging Threat in Shrimp. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(1), 978-991. <https://doi.org/10.33263/BRIAC121.978991>.
- Aranguren, L.F., Mai, H.N., Noble, B. y Dhar, A.K. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease (VP AHPND), a chronic disease in shrimp *Penaeus vannamei* population raised in Latin America, *Journal of Invertebrate Pathology* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107424>.

- Dong, X., Song, J., Chen, J., Bi, D., Wang, W., Ren, Y., Wang, H., Wang, G., Tang, K., Wang, X., y Huang, J. (2019). Conjugative Transfer of the pVA1-Type Plasmid Carrying the *pirAB*^{VP} Genes Results in the Formation of New AHPND-Causing *Vibrio*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 195. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00195>.
- Han, J.E., Tang K.F.J., Tran, L.H. y Lightner, D.V. (2015). *Photobacterium* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 113, 33–40. doi:[10.3354/dao02830](https://doi.org/10.3354/dao02830).
- Lee, C.T., Chen, I.T., Yang Y.T., Ko, T.P., Huang, Y.T., Huang, J.Y., Huang, M.F., Lin, S.J., Chen, C.Y., Linh, S.S., Lightner, D.V., Wang, H.C., Wang, A.H.J., Wang, H.C., Horb, L.I. y Lo, C.F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *PNAS*, 112(34), 10798–10803. DOI:[10.1073/pnas.1503129112](https://doi.org/10.1073/pnas.1503129112).
- Liu, L., Xiao, J., Zhang, M., Zhu, W., Xia, X., Dai, X., Pan, Y., Yan, S. y Wang, Y. (2018). A *Vibrio owensii* strain as the causative agent of AHPND in cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 153, 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.005>.
- Muthukrishnan, S. Defoirdt, T., Din, M., Yasin, I., Yusoff, F. y Ikhsan, N. (2019). Horizontal gene transfer of the *pirAB* genes responsible for Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) turns a non-*Vibrio* strain into an AHPND-positive pathogen. *bioRxiv* 2019.12.20.884320. doi: <https://doi.org/10.1101/2019.12.20.884320>.

- Ramirez, B., Guevara, M., Montoya, V. y Serna, M. (2020). Evaluación de la patogenicidad de cepas de *Vibrio* sp. que contienen los genes *pirA* Y *pirB* aislados de *Penaeus vannamei* de cultivo. *Bol Inst Mar Perú*, 35(2), 242-256.
- Tamura K., Stecher G., y Kumar S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 3022-3027.
- Varela-Mejías, A. y Peña-Navarro, N. (2014). Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS/AHPNS) en camarones cultivados: Una revisión. *Repertorio Científico*, 17(1), 25-30.
- Varela-Mejías, A., Peña-Navarro, N. y Aranguren-Caro, L.F. (2017). Necrosis aguda del hepatopáncreas: una revisión de la enfermedad en *Penaeus vannamei*. *Agronomía Mesoamericana*, 28(3), 735-745. doi:10.15517/ma.v28i3.27788.
- Velazco, R.Z., Rodrigo, M.E., Salcedo, L.A., Lazábara, I.D., Delgado, L.G., y Salas-Asencios, R. (2022). Detección molecular de la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas en muestras de langostinos de la región de tumbes. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 6(1), 1478-1491. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v6i1.1594.
- Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y., Pan, Y., Yan, S. y Wang, Y. (2017). Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by *pirAB*-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Nature Scientific Reports*, 7:42177. DOI: 10.1038/srep42177.
- Zhang, B., Liu, F., Bian, H., Liu, J., Pan, L. y Huang, J. (2012). Isolation, identification, and pathogenicity analysis of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 33(2), 56 – 62. DOI:[10.3969/j.issn.1000-7075.2012.02.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-7075.2012.02.009).