

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.14.009

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210520.1530.008.html>(2021-05-20)

非新鲜腹泻粪便样本艰难梭菌检测方法的研究*

王 浦,陈 烨[△]

(南方医科大学南方医院消化内科/广东省南方消化疾病研究所,广州 510515)

[摘要] **目的** 寻找快速有效的非新鲜腹泻粪便样本艰难梭菌检测方法。**方法** 收集 2014 年 2 月至 2019 年 2 月南方医科大学南方医院临床成人新鲜腹泻粪便标本 200 例,加保存液后冻存 1 年以上。解冻后 4℃ 静置 24 h,然后分别采用细胞毒性实验、毒素酶免疫测定和 GX-XVI 检测艰难梭菌,了解 3 种检测技术的阳性率及一致性吻合情况,并评估毒素酶免疫测定和 GX-XVI 检测灵敏度、特异度等稳定性及可靠性指标,以及约登指数,阳性似然比及阴性似然比等技术筛查指标,探讨其临床应用可能性及优势。**结果** 细胞毒性实验提示非新鲜粪便样本艰难梭菌毒素阳性 68 例,与新鲜粪便标本培养鉴定结果无差异(68 vs. 70)。GX-XVI 检测非新鲜腹泻粪便样本阳性率较细胞毒性实验无差异(32.5% vs. 34.0%)。酶免疫测定检测非新鲜腹泻粪便样本特异度高(97.0%),但灵敏度低(76.5%),与细胞毒性实验吻合度差。**结论** GX-XVI 可快速有效检测非新鲜腹泻粪便样本艰难梭菌。

[关键词] 腹泻;粪便;艰难梭菌;毒素;细胞毒性实验**[中图分类号]** R574.4**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)14-2380-04

Study on detection method of *Clostridium difficile* in non-fresh diarrhea stool samples*

WANG Pu, CHEN Ye[△]

(Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University/Guangdong Provincial South Institute of Digestive Diseases, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[Abstract] **Objective** To find a rapid and effective method for detecting *Clostridium difficile* in non-fresh diarrhea stool samples. **Methods** Two hundreds samples of fresh diarrhea feces were collected from clinical adults in Nanfang Hospital from February 2014 to February 2019, and stored frozen for more than 1 year after adding preservation solution. The samples were stood at 4℃ for 24 h after thawing, then the cytotoxicity experiment, toxin enzyme immunoassay and GX-XVI were adopted to detect *Clostridium difficile*. The positive rates of three kinds of detection technology and the consistency anastomosis were understood. The stability and reliability indexes such as sensitivity and specificity, and the technological screening indexes such as Yoden index, positive likelihood ratio and negative likelihood ratio of the toxozyme immunoassay and GX-XVI assay were evaluated. Their clinical application possibilities and advantages were investigated. **Results** The cytotoxicity test indicated that 68 non-fresh stool samples were positive for *Clostridium difficile* toxin, and there was no difference from the results of culture and identification of fresh stool samples (68 vs. 70). There was no difference in the positive rate of non-fresh diarrhea fecal samples between the GX-XVI assay and the cytotoxicity test (32.5% vs. 34.0%). The enzyme immunoassay showed high specificity (97.0%), but low sensitivity (76.5%) in non-fresh diarrhea fecal samples, and poor coincidence with the cytotoxicity test. **Conclusion** GX-XVI can rapidly and effectively detect *clostridium difficile* in non-fresh diarrhea stool samples.

[Key words] diarrhea; fecal; *clostridium difficile*; toxin; cytotoxicity assay

临床上大剂量、多疗程使用广谱抗生素,以及激素、免疫制剂等滥用^[1],破坏正常肠道菌群平衡,艰难梭菌(CD)趁势迅速生长,产生毒素破坏肠黏膜屏障,

引起艰难梭菌感染(CDI)及伪膜性肠炎,导致细菌移位,脓毒血症,甚至多器官功能衰竭,给临床带来了极大的压力与医疗支出^[2-4]。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81700461,81770529)。 作者简介:王浦(1985—),主治医师,博士,主要从事肠道微生态方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: yechen_fimmu@163.com。

CD 检测方法有多种,但因培养条件及技术要求高、耗时长,不能用于临床常规检测^[5]。目前,国内外临床广泛采用酶免疫学试验(EIA),针对艰难梭菌 A 或 B 毒素进行检测,可在 2 h 内快速完成测定。但该方法存在交叉反应、假阳性率高、特异度差^[6-7]。临床诊疗过程中,常常发现假阴性的例子,从而延误患者的治疗。利用分子生物学 PCR 技术可检测 CD 毒素基因,但不适合应用于基层医院及现场快速检测。因此,寻找新型的稳定性好、特异度高并且方便快捷的检测手段一直是研究热点^[8-13]。GeneXpert C. difficile 荧光定量 PCR 检测系统(Cepheid, GX-XVI)可以特异性的检测艰难梭菌 *tcdB* 基因,整合了传统 PCR 检测所需的 3 个步骤(样品制备、扩增和检测),全程自动化,方便快捷。研究表明,该技术检测新鲜粪便标本 CD,灵敏度好、特异度高,是一种应用前景很广泛的 CD 检测技术^[13-16]。

CD 常规要求粪便标本取样后 30 min 内检测,因此局限了检测区域,不利于大范围开展检测及常规筛查。此外,有些医疗机构不具备 CD 检测设备及技术,标本需冻存后寄往相关单位进行检测,也可能影响检测结果^[6]。本研究的目的是寻找一种快速有效的非新鲜腹泻粪便标本 CD 检测技术,通过比较 GX-XVI 及 EIA 对冻存标本检测的优劣,提高冻存标本的检测水平,以期快速、便捷、准确的用于临床检测、筛查、鉴定及预防 CDI,扩大 CD 检测覆盖范围,对于基层医疗机构合理选择用药、提高疗效、减缓细菌耐药及控制院内感染^[17],减轻医疗压力,具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

标本来源于 2014 年 2 月到 2019 年 2 月南方医科大学南方医院住院患者共 200 份新鲜腹泻粪便标本(排出后立即取样,厌氧运送,0.5 h 内接种或保存)。入选标准:年龄 ≥ 18 岁的住院患者;60 d 内接受过抗生素治疗或化疗等药物治疗,住院后 48 h 后出现腹泻,且 24 h 内腹泻次数 ≥ 3 次,不成形大便(布里斯托分类 5~7 级)。排除标准:各种类型的感染性腹泻,如细菌性痢疾、伤寒、食物中毒、原发性腹膜炎和阿米巴痢疾等;肠道功能性疾病,如肠易激综合征等;其他有除抗生素以外明确原因的腹泻,如乳糖不耐受等。剔除标准:因仪器或人为因素导致无法完成整个试验过程的样本;病例资料不全的样本。本研究经本院伦理委员会审核并通过(NFEC-2014-078)。

1.2 主要试剂及仪器

CD 标准菌株(VPI10463)来自兰州微生物研究所馈赠。难辨梭菌琼脂基础,难辨梭菌培养基选择添加剂,Eugon 肉汤等 CD 液体、固体培养基及添加剂,购自 BD 及 OXOID 公司。厌氧指示剂,API20A 快速生化鉴定试剂盒及革兰染色液套装,艰难梭菌毒素 A/B 检测试剂盒购自生物梅里埃公司。保存液:甘油

与 Eugon 肉汤按 3/7 比例混合。

1.3 方法

1.3.1 粪便标本处理

取新鲜腹泻粪便标本,按标准操作流程(SOP),行 CD 分离培养及生化鉴定,PCR 鉴定毒素。剩余粪便标本加冻存液(1:1)-80 °C 低温冰箱保存 1 年以上。检测时,快速解冻,4 °C 静置 24 h,然后分别采用细胞毒性实验(CCTA)、GX-XVI 和 EIA 检测 CD。

1.3.2 新鲜粪便标本 CD 分离培养及生化鉴定

2 mL Eugon 肉汤加入约 0.2 mL 新鲜粪便样本,混匀;把大便悬浮液放在水浴锅上 80 °C 加热 10 min,然后降温到室温,放置 5 min,取 1 滴加入艰难梭菌选择液体培养基(CCMB-TAL)液体培养管中,35 °C 厌氧培养。培养 5 d 后观察颜色变化,如 CCMB-TAL 培养基变色,表明可能有 CD 存在。另外吸取 50 μ L 悬浮液加于新鲜配制的艰难梭菌选择琼脂(CCF-AHT)平板中,37 °C 厌氧培养 72 h。如观察到粗糙、边缘不整齐疑似菌落,则纯分后接种至普通血平板,37 °C 厌氧培养 48 h。如耐氧试验无须菌生长,则革兰染色涂片,油镜下如看到较粗的革兰染色阳性,部分次极端有芽孢者怀疑为 CD。取此单个菌落接种至血平板,以 API20A 行生化鉴定。经生化鉴定后确定 CD 标本,进一步采用 PCR 技术检测 CD 毒素。

1.3.3 CCTA 检测非新鲜粪便标本 CD

解冻及静置 24 h 后粪便标本,按上述流程 CMB-TAL 培养 5 d。取上述 CMB-TAL 培养基上清液,PBS 稀释,20 mL 的上清液转移到成纤维细胞,37 °C,96 孔板,5%二氧化碳环境,含有热灭活 10% 胎牛血清的 Eugon 肉汤培养基培养 24 h,观察细胞毒效应。标准株 VPI10463 作为阳性对照。

1.3.4 GX-XVI 检测非新鲜粪便标本 CD

操作方法严格按照操作说明书进行。

1.3.5 EIA 检测非新鲜粪便标本 CD

使用艰难梭菌毒素 A/B 检测试剂盒检测 CD 毒素,操作方法严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.6 结果分析

比较新鲜及非新鲜粪便标本 CD 检出阳性率,评估冻存及解冻后静置对检出率的影响。比较 GX-XVI、EIA 对非新鲜标本 CD 的检测,评价其检测效能。

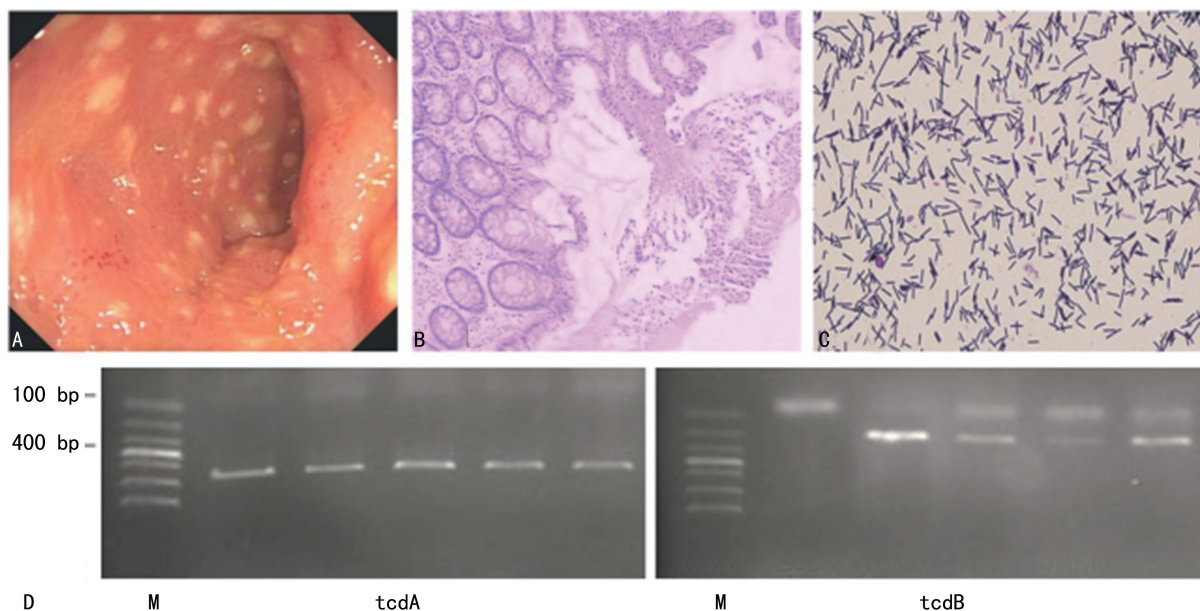
1.4 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行统计学处理。分类计数资料采用 χ^2 检验,GX-XVI、EIA 与 CCTA 的一致性采用 McNemar 及 Kappa 系数分析。GX-XVI 及 EIA 的敏感度、特异度、约登指数(Youden),阳性似然比及阴性似然比采用 MedCalc13 进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 新鲜粪便标本 CD 鉴定及菌株分离

200 份新鲜腹泻粪便标本经标准 SOP 富集培养, PCR 毒素鉴定, 最终得到 70 例产毒 CD 菌株, 见图 1。



A: 伪膜性肠炎结肠镜图片, 内镜下可见乙状结肠散在淡黄色伪膜, 黏膜充血易脆; B: 伪膜性肠炎病理图片(100 \times), 黏膜固有层中性粒细胞浸润, 上皮细胞破损, 黏膜表面有分泌物; C: CD 临床分离菌株, 革兰阳性杆菌(Gram, 1 000 \times); D: 艰难梭菌 A/B 毒素基因(tcdA/tcdB) PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳结果; M: 分子量标准 1 000 bp; tcdA: 546 bp; tcdB: 204 bp。

图 1 新鲜粪便标本 CD 分离培养鉴定

2.2 非新鲜粪便标本 CD 阳性率比较

非新鲜粪便标本分别采用 CCTA、GX-XVI 和 EIA 检测 CD。CCTA 提示 CD 毒素阳性标本数为 68 份, 与新鲜粪便标本培养鉴定结果无差异($P=0.833$, 95%CI: 0.692~1.579)。解冻后 3 种检测方法阳性率差异有统计学意义($\chi^2=6.799$, $P=0.033$), 见表 1。

表 1 解冻后 3 种检测方法阳性率比较

分组	阴性(n)	阳性(n)	合计	阳性率(%)
CCTA	132	68	200	34.0
GX-XVI	135	65	200	32.5
EIA	144	56	200	28.0
合计	411	189	600	31.5

2.3 非新鲜粪便标本 GX-XVI 与 CCTA 检测结果比较

非新鲜粪便标本经 GX-XVI 检测确定 65 例毒素阳性标本。62 例(31.0%)标本为真阳性, 129 例(64.5%)为真阴性。与 CCTA 相比, 经配对计量资料 McNemar 检验, 两种诊断结果无明显差异($P=0.508$), 吻合系数 Kappa=0.899, 见表 2。

2.4 非新鲜粪便标本 EIA 与 CCTA 检测结果比较

非新鲜粪便标本经毒素 EIA 测定, 阳性标本 56 例。52 例(26.0%)标本为真阳性, 128 例(64.0%)为真阴性。与 CCTA 相比, 经配对计量资料 McNemar 检验, 两种诊断结果有明显差异($P=0.001$), 吻合系数 Kappa=0.516, 见表 3。

表 2 非新鲜样本 GX-XVI 与 CCTA 阳性情况比较(n)

GX-XVI	CCTA		合计
	阳性	阴性	
阳性	62	3	65
阴性	6	129	135
合计	68	132	200

表 3 非新鲜样本 EIA 与 CCTA 阳性情况比较(n)

EIA	CCTA		合计
	阳性	阴性	
阳性	52	4	56
阴性	16	128	144
合计	68	132	200

2.5 一致性分析

采用医学统计学软件 MedCalc13 进行分析, 结果表明, 对于非新鲜粪便标本, 与 CCTA 相比, GX-XVI 检测的灵敏度 91.18%(95%CI: 81.8%~96.7%), 特异度 97.73%(95%CI: 93.5%~99.5%), 约登指数 73.5%, 阳性似然比 40.12(95%CI: 13.1~123.1), 阴性似然比 0.090(95%CI: 0.04~0.20)。相应地, EIA 检测非新鲜粪便标本 CD 灵敏度 76.5%, 特异度 97.0%, 约登指数 73.5%。阳性似然比 25.5, 阴性似然比为 0.242。

3 讨论

分析临床 CD 检测阳性率低的原因, 可能和标本未能及时送检, 以及临床 EIA 检测技术敏感性不足有

关,因此,设计本研究寻找能提高临床 CDI 诊断阳性率及准确率的方法。采用冻存 1 年以上的腹泻粪便标本(冻存前已行细菌学培养及鉴定),复苏后 4 ℃ 静置 24 h,然后 CCTA 检测 CD,结果表明长时间冻存及低温静置对 CD 检出率无明显影响。

分别采用 GX-XVI 及 EIA 对复苏及静置后粪便标本进行检测,结果发现,与 CCTA 相比,GX-XVI 检测 CD 灵敏度为 91.18%,漏诊少,特异度 97.73%,说明 GX-XVI 确定非患者的能力好,误诊少。Kappa 值为 0.899,基本达到与 CCTA 检测结果相一致的水平。约登指数 88.90%,说明仪器诊断真实程度高,筛查能力强。阳性似然比为 40.12,远大于 10.00,说明 GX-XVI 能正确诊断非新鲜粪便样本 CD 可能性大。GX-XVI 阴性似然比为 0.09,远小于 1,错误判断阴性的可能性小。EIA 检测非新鲜标本,特异度高,但灵敏度较差,容易出现假阴性,与 CCTA 结果一致性差。EIA 特异度较高的原因,可能与标本长期冻存,以及静置后杂菌死亡相关(CD 在极端条件下形成芽孢,生存能力较强),交叉反应概率变小。

因此,对于收集后不能立即送检的粪便标本,采用 GX-XVI 荧光定量 PCR 进行检测,灵敏度好,特异度高,与 CCTA 检测结果一致性好。且 GX-XVI 可同时检测二元毒素基因及 *tcdC* 基因 nt117 位点缺失,对于监测 B1/NAP1/027 暴发流行极为有意义。GX-XVI 从准备样品到出结果,全程自动,对工作环境和操作人员无特殊要求,1 h 内就能检测出结果,可以做到及时隔离治疗 CDI 患者。同时避免了传统培养分离鉴定及 EIA 检测过程中研究人员与传染性病原体长期接触,有效保护了医务人员及科研人员身体健康,减少暴发流行危险^[13,18]。最后,GX-XVI 大约需要 50 min 即可得出结果,方便快捷,适合大范围的检测。

综上所述,GX-XVI 可以用于大范围的 CDI 诊断,有望用于临床 CDI 的筛查。对于预防 CDI,指导临床合理选择用药,提高基层医疗机构 CDI 诊疗效率,减缓细菌耐药,控制院内感染播散,减轻医疗压力具有重要意义,可作为临床 CDI 常规筛查仪器。如果没有该设备,或者缺乏荧光定量 PCR 技术条件,可考虑采用普通 PCR 结合 EIA 检测非新鲜粪便标本,弥补普通 PCR 特异度不足的问题。

参考文献

[1] MULLANE K M, WINSTON D J, NOOKA A, et al. A randomized, placebo-controlled trial of fidaxomicin for prophylaxis of clostridium difficile-associated diarrhea in adults undergoing hematopoietic stem cell transplantation[J]. Clin Infect Dis, 2019, 68(2): 196-203.

[2] MARRA AR, PERENCEVICH E N, NELSON

R E, et al. Incidence and outcomes associated with clostridium difficile infections: a systematic review and meta-analysis[J]. JAMA Netw Open, 2020, 3(1): e1917597.

- [3] MORA P M, BUIE R, LIOU J I, et al. Outcomes of community and healthcare-onset clostridium difficile infections[J]. Clin Infect Dis, 2019, 68(8): 1343-1350.
- [4] REVELES K R, DOTSON K M, GONZALES-LUNA A, et al. Clostridioides (formerly clostridium) difficile infection during hospitalization increases the likelihood of nonhome patient discharge[J]. Clin Infect Dis, 2019, 68(11): 1887-1893.
- [5] 吴晓燕, 李小四, 冯雪君, 等. 艰难梭菌培养联合酶法检测毒素蛋白(A/B)的临床应用价值探索[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(18): 2231-2233, 2236.
- [6] 王力维, 阎敏娜. 临床粪便标本中艰难梭菌毒素免疫学稳定性研究[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2019, 35(6): 1-4.
- [7] AKAMATSU Y, MORISHITA S, CHIKUMI H, et al. Evaluation of antigen-positive toxin-negative enzyme immunoassay results for the diagnosis of toxigenic Clostridium difficile infection[J]. J Med Invest, 2018, 65(1/2): 131-135.
- [8] KRUTOVA M, WILCOX M H, KUIJPER E J. A two-step approach for the investigation of a Clostridium difficile outbreak by molecular methods[J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(11): 1300-1301.
- [9] KONG L Y, EYRE D W, CORBEIL J, et al. Clostridium difficile: investigating transmission patterns between infected and colonized patients using whole genome sequencing[J]. Clin Infect Dis, 2019, 68(2): 204-209.
- [10] GERDING D N, CORNELLY O A, GRILL S, et al. Cadazolid for the treatment of Clostridium difficile infection: results of two double-blind, placebo-controlled, non-inferiority, randomised phase 3 trials[J]. Lancet Infect Dis, 2019, 19(3): 265-274.
- [11] EYRE D W, PETO T E, CROOK D W, et al. Hash-based core genome multilocus sequence typing for clostridium difficile[J]. J Clin Microbiol, 2019, 58(1): e01019-01037.
- [12] KOKAI-KUN J F, ROBERTS T, COUGHLIN O, et al. Use of ribaxamase (下转第 2388 页)

- ogy[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(23):2167-2173.
- [5] LUPI A, ROGNONI A, CAVALLINO C, et al. Intracoronary vs intravenous bivalirudin bolus in ST-elevation myocardial infarction patients treated with primary angioplasty[J]. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, 2016, 5(5):487-496.
- [6] 田进文, 彭利, 刘谟焘, 等. 逆向精确溶栓联合支架植入术治疗急性冠状动脉闭塞病变 1 例[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2013(8):633-635.
- [7] O'GARA P T, KUSHNER F G, ASCHEIM D D, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-Elevation myocardial infarction: executive summary a report of the American college of cardiology foundation/American heart association task force on practice guidelines[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61(4):485-510.
- [8] 安佰富, 张广成, 张雪莲, 等. 高血栓负荷的急性心肌梗死患者开通罪犯血管后延迟支架置入的临床效果[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(20):5031-5032.
- [9] 邱晓娜, 马洪山, 张萍, 等. 高血栓负荷 ST 段抬高型心肌梗死患者静脉内和冠状动脉内给予替罗非班对心肌组织灌注的比较研究[J]. *中国循环杂志*, 2019, 34(1):50-54.
- [10] 沈冲, 王乐丰. 联合血栓抽吸在 ST 段抬高型心肌梗死患者急诊经皮冠状动脉介入治疗中的应用的效果[J]. *中华心血管病杂志*, 2019, 47(1):49-55.
- [11] 张文艳, 刘寅, 肖健勇, 等. 冠状动脉内溶栓结合急诊冠状动脉介入治疗急性 ST 段抬高型心肌梗死患者的疗效观察[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2019(11):1146-1149.
- [12] 农京国, 田进文, 彭亮, 等. 冠状动脉内逆向精确溶栓术在急性 ST 段抬高型心肌梗死患者行直接经皮冠状动脉介入治疗中应用的研究[J]. *中国循环杂志*, 2016, 31(12):1160-1164.
- [13] 郭自同, 沈鑫, 穆叶赛·尼扎提, 等. 远段溶栓联合经皮冠状动脉介入治疗急性 ST 段抬高型心肌梗死的疗效观察[J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2017, 25(11):634-638.
- [14] CHOO E H, KIM P J, CHANG K, et al. The impact of no-reflow phenomena after primary percutaneous coronary intervention: a time-dependent analysis of mortality[J]. *Coron Artery Dis*, 2014, 25(5):392-398.
- [15] 杨春华. 注射用重组人尿激酶原逆向溶栓联合冠脉支架植入术治疗急性 ST 段抬高型心肌梗死的临床效果[J]. *实用临床医学*, 2019, 20(3):13-15.
- [16] 农京国, 白静, 彭亮, 等. 冠状动脉内逆向溶栓在急性 ST 段抬高型心肌梗死患者直接介入治疗术后 1 年随访[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2016, 18(9):905-908.

(收稿日期:2020-10-11 修回日期:2021-03-11)

(上接第 2383 页)

- (SYN-004), a β -lactamase, to prevent clostridium difficile infection in β -lactam-treated patients: a double-blind, phase 2b, randomised placebo-controlled trial[J]. *Lancet Infect Dis*, 2019, 19(5):487-496.
- [13] 于翔, 杨昆豫, 李嘉嘉, 等. 自建分子检测方法在腹泻患者艰难梭菌感染调查中的应用[J]. *重庆医学*, 2020, 49(7):1159-1163.
- [14] GRANATO P A, HANSEN G, HERDING E, et al. Performance comparison of the cobas Liat and Cepheid GeneXpert systems for Clostridium difficile detection[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7):e0200498.
- [15] 王山梅, 王则宇. 一种新型艰难梭菌产毒株检测试剂临床应用研究[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(48):3969-3972.
- [16] SENOK A C, ALDOSARI K M, ALOWAIS HEQ R A, et al. Detection of clostridium difficile antigen and toxin in stool specimens: comparison of the C. difficile quik chek complete enzyme immunoassay and GeneXpert C. difficile polymerase chain reaction assay[J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2017, 23(4):259-262.
- [17] GANETSKY A, HAN J H, HUGHES M E, et al. Oral vancomycin prophylaxis is highly effective in preventing clostridium difficile infection in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients[J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 68(12):2003-2009.
- [18] ZERVOU F N, ZACHARIOUDAKIS I M, MYLONAKIS E. Carriers of clostridioides (clostridium) difficile; to the center of focus for controlling the rate of infection[J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 69(9):1645-1646.

(收稿日期:2020-10-11 修回日期:2021-03-15)