

· 细菌真菌感染 · 专家论坛 ·

非培养检测方法在终末期肝病合并侵袭性真菌感染诊断中的应用

金燕琪¹ 章益民^{1,2}

¹浙江大学医学院附属第一医院传染病诊治国家重点实验室、国家感染性疾病临床医学研究中心、国家传染病医学中心、感染性疾病诊治协同创新中心, 杭州 310003; ²浙江大学医学院附属第一医院海宁院区(海宁市人民医院)感染病科, 浙江嘉兴 314400

通信作者: 章益民, Email: 1307020@zju.edu.cn

【摘要】侵袭性真菌感染(IFI)已经成为终末期肝病(ESLD)患者治疗失败乃至死亡的重要原因。然而,由于临床表现不一,真菌培养阳性率低及培养周期时间长等,ESLD 合并 IFI 的早期、准确诊断具有挑战性。近年来,非培养检测方法如直接显微镜镜检(包括真菌荧光染色)、血清学检测方法及分子生物学方法被引入 IFI 的检测,逐渐成为有广泛临床应用前景的早期检测手段。本文就 ESLD 合并 IFI 的流行病学、IFI 非培养检测方法及其在 ESLD 合并 IFI 诊断中的应用作一阐述。

【关键词】感染;真菌;终末期肝病;慢加急性肝衰竭;肝硬化急性失代偿;诊断

基金项目:浙江大学 2020 年省教育厅抗疫专项(94);浙江大学传染病诊治国家重点实验室 2021 年自主研究项目

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20210406-00066

The application of non-culture tests in the diagnosis of end-stage liver disease complicated with invasive fungal infection

Jin Yanqi¹, Zhang Yimin^{1,2}

¹State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, National Clinical Research Center for Infectious Diseases, National Medical Center for Infectious Diseases, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China; ²Department of Infectious Diseases, Haining Campus, the First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Jiaxing 314400, Zhejiang, China

Corresponding author: Zhang Yimin, Email: 1307020@zju.edu.cn

【Abstract】 End-stage liver disease (ESLD) complicated with invasive fungal infection (IFI) has become one of the most important causes of deterioration even death in patients with ESLD. However, due to the atypical clinical manifestations, low positive rate of fungal culture and long culture cycle time, early and accurate diagnosis of ESLD with IFI is a big challenge. In recent years, some novel non-culture tests involving direct microscopy examination (including fungal fluorescence staining), serological tests, and molecular biology-based tests have facilitated early diagnosis of IFI with broad clinical application prospects. In this article, the epidemiology of ESLD complicated with IFI, the non-culture tests for IFI, and the application of non-culture tests in the diagnosis of ESLD complicated with IFI are overviewed.

【Key words】 Infection; Fungi; End-stage of liver disease; Acute-on-chronic liver failure; Acute decompensation of liver cirrhosis; Diagnosis

Fund program: Zhejiang Education Department 2020 Special Project Against COVID-19-Zhejiang University (94);Independent Task of State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases of Zhejiang University(2021)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20210406-00066

终末期肝病(ESLD)指各种慢性肝脏损害所致的肝病晚期阶段,主要表现为肝功能严重受损和失代偿^[1],包括慢加急性肝衰竭(ACLF)、肝硬化急性失代偿(ADLC)、慢性肝衰竭(CLF)和晚期肝细胞癌。由于抗菌药物使用频率高、住院次数多和使用侵入性治疗等因素,ESLD 患者侵袭性真菌感染(IFI)已经构成其治疗失败乃至死亡的重要原因^[2-3]。IFI 指真菌侵入人体组织、血液,并生长繁殖引起炎症反应、组织损害乃至器官功能障碍的病理改变过程,包括深部真菌感染(无菌部位)及真菌血症^[4]。由于缺乏具体体征和症状,真菌培养具有阳性率低以及培养周期时间长等缺点,ESLD 合并 IFI 的早期、精准的诊断通常具有挑战性。非培养检测方法如直接显微镜镜检(包括真菌荧光染色)、血清学检测方法及分子生物学方法已成为 ESLD 合并 IFI 具有发展前景的早期检测手段。

一、ESLD 合并 IFI 的流行病学

根据多项研究,IFI 在 ESLD 患者中的发生率约为 15%^[3,5],HBV 相关 ACLF 中的 IFI 发病率较高(47.6%)^[6]。在 ESLD 患者中,侵袭性念珠菌病(IC)是主要的 IFI,发生率约为 64.1%;其次是侵袭性曲霉病(IA),发生率约为 35.8%^[5]。对于不同的免疫功能异常,IFI 的病原体有所不同^[7],念珠菌往往和患者的黏膜屏障破坏以及真菌的定植密切相关;曲霉病往往和细胞免疫功能异常相关,尤其是粒细胞减少或缺乏的患者。ESLD 患者往往同时存在黏膜屏障的异常和粒细胞减少,因此临床上 IC 和 IA 均常见。ESLD 合并 IFI 最常见的部位是呼吸道和泌尿道,其次是胃肠道、血流、脑部和自发性真菌性腹膜炎^[5-6,8]。3 个月内使用抗生素、肾衰竭、糖尿病、更高的终末期肝病模型(MELD)评分以及脑或呼吸器官衰竭等是 IFI 发展的独立危险因素^[3,5]。ESLD 患者发生 IFI 时表现往往隐匿、不特异。在一项大样本、多中心的研究中,肝硬化患者发生 IC 时,仅 60%患者表现为发热^[9]。合并 IFI 的 ESLD 患者死亡率(57%~77%)显著高于未合并的患者(14%~20%)^[3,5-6,10-13]。

二、IFI 的非培养检测方法

1. 直接显微镜镜检

样本直接涂片具有操作简便,检测快速等优点^[14]。欧洲癌症研究和治疗组织/侵袭性真菌感染协作组和美国国立变态反应和感染病研究院真菌病研究组(EORTC/MSG)侵袭性真菌病专家指南 2020 修订版[以下简称“EORTC/MSG 指南(2020 年版)”]^[14]提出将通过针吸或活检组织获得的样本,经直接显微镜检查,发现菌丝或黑色酵母样形态伴有相关组织损伤的证据可作为诊断丝状真菌的证据:隐球菌是否有出芽,念珠菌是否有假菌丝或真菌丝作为诊断酵母菌感染的诊断依据。对于疑似丝状真菌感染,样本推荐使用痰液、支气管肺泡灌洗液(BALF)、支气管刷片或抽吸液,显微镜镜检下如有真菌成分提示丝状真菌。有研究通过显微镜直接观察 IA 患者的肺活检组织,发现曲霉的形态表现为透明和分隔的双分枝菌丝,分枝呈 45°且宽度均匀^[15]。由于样本直接涂片镜检在有菌部位只有发现大量菌丝才具有诊断意义,并且样本取材的好坏直接影响结果,因而阳性率很低,不能将真菌鉴定到种的水平^[16-17],因此阴性结果不能排除感染。

钙荧光白(CFW)是一种非特异性荧光染色剂,可以和真菌细胞壁的几丁质、纤维素和其他含有 β -(1,4)-糖苷键的碳水化合物紧密结合^[18]。CFW 吸收紫外光后发出明亮的荧光,真菌轮廓和黑暗的背景在荧光显微镜下对比明显^[19],可以提高 IFI 阳性诊断率。

2. 血清学检测方法

(1) (1,3)- β -D 葡聚糖检测(G 试验)

G 试验适用于除隐球菌和接合菌(包括毛霉菌和根霉菌等)外所有深部真菌感染的早期诊断,尤其是念珠菌和曲霉^[20]。EORTC/MSG 指南(2020 版)^[14]提出在适当的临床环境中,包括伴和不伴中性粒细胞减少的血液系统恶性肿瘤、造血干细胞移植后中性粒细胞减少的患者,以及由于胃肠道手术而反复发生吻合口漏,上消化道穿孔的 IC 风险较高(>10%)

的 ICU 患者或有临床怀疑感染的坏死性胰腺炎患者,2 次或多次 ≥ 80 ng/L 的血清 G 试验水平可用于诊断 IFI^[21-22],同时建议使用 Fungitell 检验的单一阈值 (>80 ng/L)。多项血清 G 试验 IFI 的检测荟萃分析研究中,G 试验对 IC 的敏感性和特异性分别为 65%~85%和 75%~85%,对 IA 的敏感性和特异性分别为 71%~82%和 82%~85%^[22-23]。在对 IFI 检测中,G 试验灵敏度和特异性都很好,且 G 试验检测样本采集方便,检测时间短,可作为早期诊断的依据,但 G 试验的不足之处在于其不能区分真菌种属,不能诊断接合菌和隐球菌。

(2) 半乳甘露聚糖(GM)试验

GM 是曲霉菌特有的细胞壁多糖成分,可用于 IA 的早期诊断^[24]。曲霉菌检测广泛使用 Bio-Rad 曲霉菌抗原检测试剂盒(Platelia Aspergillus Ag)^[25]。曲霉菌感染时,GM 的释放量与菌量呈正比,可以反映感染的严重程度,动态监测血清 GM 水平可反映治疗的效果。EORTC/MSG 指南(2020 版)^[4]将 GM 试验作为 IA 诊断标准的真菌学证据之一,即单一血清 GM 试验 (≥ 1.0)或 BALF-GM 试验 (≥ 1.0)或血清 GM 试验 (≥ 0.7)合并 BALF-GM 试验 (≥ 0.8),脑脊液 GM 试验 (≥ 1.0)即可作为诊断依据。根据多项 GM 试验在 IA 诊断中应用的研究发现,GM 试验的特异性和敏感性分别为 73%~90%和 72%~90%^[26-27]。

3. 分子生物学方法

(1) 聚合酶链反应(PCR)

应用 PCR 技术可快速、特异地检测真菌感染患者各种临床样本,如血液、BALF 及组织样本等。EORTC/MSG 指南(2020 版)^[4]提出,PCR 具有检测曲霉菌种属的独特能力,曲霉菌 PCR 检测是筛选和确认可疑 IA 的检测方法。对于疑似 IFI 患者,该指南将符合“连续 2 次或以上血浆,血清或全血样本 PCR 试验阳性;BALF 样本 2 次或多次重复 PCR 试验阳性;至少 1 次 PCR 试验在血液样本及 1 次 PCR 试验在 BALF 样本中阳性”其中之一条纳入确诊 IA 的标准^[4]。对于活检组织中发现菌丝阳性的患者,指南中推荐 PCR 结合 DNA 测序扩增真菌 DNA。此外,已有研究表明 PCR 能够直接从临床样本中鉴定

与三唑抗真菌药物耐药相关的某些突变^[28]。因此,PCR 检测在 IFI 疑似患者中具有快速、准确诊断的价值,同时对培养阴性的样本具有补充诊断的意义。然而,由于不同实验室使用的引物、反应条件及仪器不同,不同研究 PCR 诊断 IFI 的敏感度和特异性相差较大。PCR 只能检测已知的特定病原体,难以用于未知微生物的检测,是诊断 IFI 的最大障碍。

(2) 二代测序(NGS)

NGS 可鉴定出样本中所含核酸的种类,并对病原体的序列数、覆盖度等进行定量分析,为疑难危重感染提供精准快速的诊断依据。NGS 检测具有无偏倚性、覆盖广和快速等优点,补充了传统病原学诊断的不足,有极大的临床应用前景。Shishido 等^[29]使用游离 DNA-NGS 技术检测 1 例中枢神经 IA 肝移植患者的血清样本,结果提示曲霉菌阳性。在 1 例疑似 IFI 的皮炎患者诊断中,NGS 技术检测 BALF 提示存在杰氏肺囊虫、烟曲霉菌、米根霉菌 3 种真菌,且根据 NGS 结果调整抗真菌治疗后患者症状得到显著改善^[30]。在一项基于扩增子的 NGS 技术鉴定真菌染色阳性的福尔马林固定石蜡包埋组织病原体的研究中,NGS 检测 44 份来自 35 例 IFI 患者的样本,检测到了 54 种真菌病原体,其中包括 40 种丝状真菌,10 种酵母菌以及 4 种双相真菌,该检测结果与病理结果完全一致^[31]。

三、非培养检测方法对 ELSD 合并 IFI 诊断的价值

1. G 试验

一项对 264 例 ACLF 患者的回顾性分析研究中,Verma 等^[9]首次评估了 G 试验在 ACLF 合并 IFI 高危患者早期诊断中的作用。该研究发现,在 ACLF 患者中,G 试验(80 ng/L)诊断 IFI 的灵敏度和特异性分别为 97.4%和 60.0%。此外,G 试验水平及其阳性有可能作为 ACLF 合并 IFI 高死亡率的预测指标。因此,在 ESLD 疑似合并 IFI 的临床环境中,G 试验能提供较高的早期诊断价值,但同时亟待更多的研究为其诊断价值提供充足的临床证据。

2. GM 试验

Verma 等^[9]评估了 GM 试验在 ACLF 患者中诊

断临床可疑 IFI 的价值,其特异性可达 100%。在一项描述了 3 例肝硬化急性失代偿合并 IA 的病例系列报道中,有 2 例患者呈血清 GM 阳性,而 3 例 BLAF-GM 均呈阳性^[32]。Falcone 等^[33]描述了 2 例 ESLD 合并 IA 的病例系列报道,GM 试验在痰液中均表现为阳性而在血清中均表现为阴性。因此在 ESLD 患者中,GM 试验阳性对 IA 有较高的诊断特异性。同时,在 IA 血清学证据尚不足并且能获得呼吸道样本的临床环境下,呼吸道样本的 GM 实验阳性对 ESLD 患者合并 IA 有较强的早期诊断价值。

3. PCR

一项在 46 例 ESLD 患者中筛选合并 IFI 及评估其危险因素的研究中,12 例患者确诊合并 IFI,PCR 检测出 13 个样本(6 个腹水样本和 7 个血液样本)真菌 DNA 阳性,12 例传统培养阴性的 ESLD 患者中有 3 例的 PCR 结果为阳性^[3]。因此,PCR 检测在 ESLD 患者疑似合并 IFI 需要确诊时具有快速、准确的意义,同时对培养阴性的样本具有补充诊断价值。

四、结语和展望

各种非培养检测方法在 ESLD 合并 IFI 的诊断中各有优点,但也有其局限性,如何将这些方法合理、综合的应用需要进一步的研究。在一项涉及 125 例 IFI 高危患者的临床研究中,作者在血清样本中通过组合使用曲霉菌 PCR 及 GM 试验评估了非培养检测方法在 IFI 中的诊断价值^[34],实现了较高的敏感性(98.2%)和特异性(89.3%),这种思路也可以在 ESLD 合并 IFI 的诊断中借鉴。随着对病原体早期诊断和精准诊断要求的提高,亟待更多的以 NGS 为代表的分子生物学方法在 ESLD 合并 IFI 中的广泛应用。另外,随着非培养检测方法在 ESLD 合并 IFI 诊断中的深入应用,对不同年龄、ESLD 亚型、真菌类型、感染部位 IFI 数据的不断增加,循证医学证据级别可望获得显著提升。期望在不久的将来,非培养检测方法在 ESLD 合并 IFI 诊断中的应用获得广泛共识,形成清晰的路线图。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] Cheruvattath R, Balan V. Infections in patients with end-stage

liver disease[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2007, 41(4):403-411. DOI: 10.1097/01.mcg.0000248018.08515.9.

- [2] Jalan R, Fernandez J, Wiest R, et al. Bacterial infections in cirrhosis: a position statement based on the EASL Special Conference 2013 [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(6):1310-1324. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.01.024
- [3] Hassan EA, Abd El-Rehim AS, Hassany SM, et al. Fungal infection in patients with end-stage liver disease: low frequency or low index of suspicion[J]. *Int J Infect Dis*, 2014, 23:69-74. DOI: 10.1016/j.ijid.2013.12.014.
- [4] Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for research and treatment of cancer and the mycoses study group education and research consortium[J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(6):1367-1376. DOI: 10.1093/cid/ciz1008.
- [5] Verma N, Singh S, Taneja S, et al. Invasive fungal infections amongst patients with acute-on-chronic liver failure at high risk for fungal infections[J]. *Liver Int*, 2019, 39(3):503-513. DOI: 10.1111/liv.13981.
- [6] Lin LN, Zhu Y, Che FB, et al. Invasive fungal infections secondary to acute-on-chronic liver failure: a retrospective study[J]. *Mycoses*, 2013, 56(4):429-433. DOI: 10.1111/myc.12044.
- [7] Bajaj JS, Liu EJ, Kheradman R, et al. Fungal dysbiosis in cirrhosis [J]. *Gut*, 2018, 67(6):1146-1154. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-313170.
- [8] Bajaj JS, Reddy RK, Tandon P, et al. Prediction of fungal infection development and their impact on survival using the NACSELD Cohort [J]. *Am J Gastroenterol*, 2018, 113(4):556-563. DOI: 10.1038/ajg.2017.471.
- [9] Bassetti M, Peghin M, Carnelutti A, et al. Clinical characteristics and predictors of mortality in cirrhotic patients with candidemia and intra-abdominal candidiasis: a multicenter study[J]. *Intensive Care Med*, 2017, 43(4):509-518. DOI: 10.1007/s00134-017-4717-0.
- [10] Fernández J, Acevedo J, Wiest R, et al. Bacterial and fungal infections in acute-on-chronic liver failure: prevalence, characteristics and impact on prognosis [J]. *Gut*, 2018, 67(10):1870-1880. DOI: 10.1136/gutjnl-2017-314240.
- [11] Lahmer T, Messer M, Schwerdtfeger C, et al. Invasive mycosis in medical intensive care unit patients with severe alcoholic hepatitis [J]. *Mycopathologia*, 2014, 177(3/4):193-197. DOI: 10.1007/s11046-014-9740-x.
- [12] Chen J, Yang Q, Huang J, et al. Risk factors for invasive pulmonary aspergillosis and hospital mortality in acute-on-chronic liver failure patients: a retrospective-cohort study [J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(12):1625-1631. DOI: 10.7150/ijms.6824.
- [13] Hwang SY, Yu SJ, Lee JH, et al. Spontaneous fungal peritonitis: a severe complication in patients with advanced liver cirrhosis [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014, 33(2):259-264. DOI: 10.1007/s10096-013-1953-2.

- [14] Kozel TR, Wickes B. Fungal diagnostics [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014, 4 (4): a019299. DOI: 10.1101/cshperspect.a019299.
- [15] Moura S, Cerqueira L, Almeida A. Invasive pulmonary aspergillosis: current diagnostic methodologies and a new molecular approach[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018, 37 (8): 1393–1403. DOI: 10.1007/s10096-018-3251-5.
- [16] Zarrinfar H, Saber S, Kordbacheh P, et al. Mycological microscopic and culture examination of 400 bronchoalveolar lavage (BAL) samples[J]. Iran J Public Health, 2012, 41(7): 70–76.
- [17] Muñoz P, Alcalá L, Sánchez Conde M, et al. The isolation of *Aspergillus fumigatus* from respiratory tract specimens in heart transplant recipients is highly predictive of invasive aspergillosis [J]. Transplantation, 2003, 75 (3): 326–329. DOI: 10.1097/01.TP.0000044358.99414.B8.
- [18] Hoch HC, Galvani CD, Szarowski DH, et al. Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls[J]. Mycologia, 2005, 97(3): 580–588. DOI: 10.3852/mycologia.97.3.580.
- [19] Safavi M, Coarsey C, Esiobu N, et al. Advances in *Candida* detection platforms for clinical and point-of-care applications[J]. Crit Rev Biotechnol, 2017, 37 (4): 441–458. DOI: 10.3109/07388551.2016.1167667.
- [20] Clancy CJ, Nguyen MH. Diagnosing invasive candidiasis[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(5) DOI: 10.1128/JCM.01909-17.
- [21] Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korbila IP, et al. Accuracy of β -D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis[J]. Clin Microbiol Infect, 2013, 19(1): 39–49. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03760.x.
- [22] Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, et al. Diagnostic accuracy of serum 1,3- β -D-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(1): 7–15. DOI: 10.1128/JCM.05267-11.
- [23] Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, et al. β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis[J]. Clin Infect Dis, 2011, 52(6): 750–770. DOI: 10.1093/cid/ciq206.
- [24] Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Wang J, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2015, 2015 (12): CD007394. DOI: 10.1002/14651858.
- [25] Dichtl K, Seybold U, Ormanns S, et al. Evaluation of a novel aspergillus antigen enzyme-linked immunosorbent assay[J]. J Clin Microbiol, 2019, 57 (7): e00136–19. DOI: 10.1128/JCM.00136-19.
- [26] Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis[J]. Lancet Infect Dis, 2004, 4(6): 349–357. DOI: 10.1016/S1473-3099(04)01045-X.
- [27] Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Wang J, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2015, (12): CD007394. DOI: 10.1002/14651858.CD007394.pub2.
- [28] White PL, Posso RB, Barnes RA. Analytical and clinical evaluation of the pathonostics aspergenius assay for detection of invasive aspergillosis and resistance to azole antifungal drugs directly from plasma samples[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(8): 2356–2366. DOI: 10.1128/JCM.00411-17.
- [29] Shishido AA, Vostal A, Mayer R, et al. Diagnosis of central nervous system invasive aspergillosis in a liver transplant recipient using microbial cell-free next generation DNA sequencing[J]. Transpl Infect Dis, 2021; e13592. DOI: 10.1111/tid.13592.
- [30] Zhang K, Yu C, Li Y, et al. Next-generation sequencing technology for detecting pulmonary fungal infection in bronchoalveolar lavage fluid of a patient with dermatomyositis: a case report and literature review[J]. BMC Infect Dis, 2020, 20(1): 608. DOI: 10.1186/s12879-020-05341-8.
- [31] Larkin P, Lawson KL, Contreras DA, et al. Amplicon-based next-generation sequencing for detection of fungi in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: correlation with histopathology and clinical applications[J]. J Mol Diagn, 2020, 22(10): 1287–1293. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2020.06.017.
- [32] Prodanovic H, Cracco C, Massard J, et al. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with decompensated cirrhosis: case series [J]. BMC Gastroenterol, 2007, 7: 2. DOI: 10.1186/1471-230X-7-2.
- [33] Falcone M, Massetti AP, Russo A, et al. Invasive aspergillosis in patients with liver disease[J]. Med Mycol, 2011, 49(4): 406–413. DOI: 10.3109/13693786.2010.535030.
- [34] Gupta P, Ahmad A, Khare V, et al. Comparative evaluation of pan-fungal real-time PCR, galactomannan and (1-3)- β -D-glucan assay for invasive fungal infection in paediatric cancer patients[J]. Mycoses, 2017, 60(4): 234–240. DOI: 10.1111/myc.12584.

(收稿日期: 2021-04-06)