中图分类号:R917　　文献标志码:A　　文章编号:1006－4931(2025)12－0076－05
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2025.12.017

药品微生物检验环境菌库建立实践*

黄韵璇,朱晓燕,高　颖,陈伟盛△

(广东省广州市药品检验所,广东 广州　510000)

摘要:目的　建立药品微生物检验环境菌库。**方法**　以某非无菌药品微生物检验洁净实验室为例,于2020—2023年按2020年版《中国药典(四部)》要求的监测频次和项目收集浮游菌、沉降菌和表面微生物,按纯化水微生物限度检查法收集水系统微生物,采用革兰染色和VITEK生化分析鉴定单个微生物菌株,采用二代测序技术检测单个区域和水系统样本中微生物16S rRNA基因组序列,以鉴定细菌菌种和分布。**结果**　研究期间表面微生物与水系统菌种的检出频次的变化趋势均相似。实验操作区主要分布以葡萄球菌属菌株为主的革兰阳性菌(60.93%),实验背景区及缓冲区主要污染菌属为葡萄球菌属菌种,水系统富含嗜糖假单胞菌、弧形茎菌、鞘氨醇单胞菌属菌种和新鞘氨醇菌属菌种等革兰阴性菌。水系统的微生物基因测序结果与表型鉴定结果相近且相互补充。**结论**　基于生化反应与基因鉴定结果建立的非无菌药品微生物检验的洁净环境菌数据库,可用于常见菌群信息和趋势的分析。该研究为药品检验实验室和药品生产厂房洁净环境进一步开展微生物控制管理和溯源分析提供了数据支持和参考。

关键词:环境菌库;VITEK生化鉴定;药品微生物检验;二代测序技术;洁净实验室

Establishment Practice of A Environmental Bacteria Library for Pharmaceutical Microbiology Testing

HUANG Yunxuan, ZHU Xiaoyan, GAO Ying, CHEN Weisheng

(Guangzhou Institute for Drug and Control, Guangzhou, Guangdong, China 510000)

Abstract: Objective　To establish an environmental bacteria library for pharmaceutical microbiology testing. **Methods**　A clean laboratory for pharmaceutical microbiological examination of non－sterile products was taken as an example, planktonic bacteria, settling bacteria, and surface microorganisms were collected according to the monitoring frequency and items required by the 2020 edition of the *Chinese Pharmacopoeia* (Volume Ⅳ) from 2020 to 2023. Microorganisms in the water system was collected using the purified water microbial limit test method, and individual microbial strains were identified using Gram staining and VITEK biochemical analysis. The 16S rRNA metagenome sequences of microorganisms in individual regions and water system samples were detected using next－generation sequencing technology to identify bacterial strains and distribution. **Results**　The trend of changes in the frequency of identification of surface microorganisms and water system strains during the research period was similar. The experimental operation area was mainly distributed with Gram positive bacteria (60.93%) mainly belonging to the *Staphylococcus* species, in the experimental background and buffer zone there were mainly contaminated with *Staphylococcus* species, and the water system was rich in Gram negative bacteria such as *Pseudomonas saccharophila*, *Caulobacter vibrioides*, *Sphingomonas* spp., and *Novosphingobium* spp.. The results of microbial gene sequencing and phenotype identification in the water system were similar and complementary to each other. **Conclusion**　A clean environmental bacteria database for pharmaceutical microbiological examination of non－sterile products testing based on biochemical reactions and genetic identification results can be used for the analysis of common microbial community information and trends. This study provides data support and reference for further microbial control

*基金项目:广东省广州市市场监督管理局科技项目[2023KJ34]。

第一作者:黄韵璇,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为药品、化妆品微生物检验,(电子信箱)hyx612@163.com。

△通信作者:陈伟盛,男,大学本科,主任药师,研究方向为药品、化妆品微生物检验,(电子信箱)petaispear@163.com。

用[J]. 中国无机分析化学,2011,1(4):72－76.

[9] CNAS－GL01,检测和校准实验室能力认可准则[S].

[10] CNAS－GL005:2018,实验室内部研制质量控制样品的指南[S].

[11] 王少华,李　妍,张　涛,等. 血筛四项复合质控品的制备及性能评价[J]. 中国生物制品学杂志,2020,33(11):1253－1257.

[12] 吴先玉,张　杰,帅　荣,等. 浅谈如何做好ELISA法的质量控制[J]. 中外医学研究,2012,10(26):48－49.

[13] 王治国,李小鹏,武平原. 临床检验定量测定室内质控系统的建立[J]. 检验医学,2004,19(1):6－9.

[14] WS/T 641－2018,临床检验定量测定室内质量控制[S].

[15] 字立源,兰晓燕,黄苏金,等. 时实荧光定性PCR实验室内质控方法的建立及探讨[J]. 系统医学,2021,6(1):38－40.

[16] 刘玉波,王爱民,陈顺琴,等. 质控图在测定血液中乙醇含量时的应用[J]. 理化检验:化学分册,2021,57(11):4.

[17] GB/T 17989.2－2020,控制图 第2部分:常规控制图[S].

[18] 丁玮洁,夷　峥,王雪亮,等. 自制新型冠状病毒抗体检测质控品及其临床应用评价[J]. 现代检验医学杂志,2023,38(6):178－184.

(收稿日期:2024－08－02;修回日期:2025－03－16)

management and traceability analysis in clean environments of drug inspection laboratories and drug production building.

Key words: environmental bacteria library; VITEK biochemical identification; pharmaceutical microbiology testing; next - generation sequencing technology; clean room

2020年版《中国药典(四部)》9203药品微生物实验室质量管理指导原则中规定:“微生物实验室应按相关国家标准制定完整的洁净室(区)和隔离系统的验证和环境监测标准操作规程”,“环境监测按药品洁净实验室微生物监测和控制指导原则(指导原则9205)进行”。为保证药品微生物检验结果的可靠性,微生物实验应在专属的区域进行,如非无菌药品微生物限度检查应在不低于D级背景下的B级洁净区域进行,以降低交叉污染、假阳性结果和假阴性结果出现的风险[1]498-503。各国的药品生产质量管理规范(GMP)等法规和相关指导原则均要求洁净区域的微粒和微生物数量需达到相应洁净级别的要求[2],而通过监测浮游菌、沉降菌、表面微生物和水系统微生物等关键指标实现的环境监控和相应环境菌库建立是对洁净环境微生物污染情况进行评估及溯源分析的重要措施[3]。建立环境菌库主要利用微生物鉴定技术展开,根据鉴定水平选择表型生化鉴定或基因鉴定[1]503-506。随着生物分析技术的发展,二代基因测序技术和分析手段已广泛用于微生物群落多样性和群落组成差异分析[4]。基于此,本研究中在传统表型鉴定基础上结合二代测序技术,以非无菌药品微生物检验实验室为例,全面鉴定药品检验相关的洁净环境微生物,以此获得洁净室(区)内微生物群落的正常分布和菌株详细信息,并根据菌种的异常变化和趋势分析总结洁净室(区)是否受控,评估相应的纠偏措施是否恰当。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

仪器:Milliflex Plus Pump型通用型过滤系统、MAS-100型空气浮游菌采集器(德国Merck公司);AxioScope型高级正置显微镜(德国Zeiss公司);VITEK 2 COMPACT型自动化鉴定药敏仪(法国bioMérieux公司);C1000 Touch型PCR扩增仪(美国Bio-Rad公司);Miseq型高通量测序仪(美国Illumina公司);I-Sanger型多媒体智能数据库(MIDS)分析系统(上海美吉生物医药科技有限公司)。

试药:胰酪大豆胨琼脂固体培养基(TSA,增菌培养基直径90 mm,上海诺狄生物科技有限公司,批号分别为4321200227-4、4321200429-3、4321200609-1、4321201011-4、4321201213-12、4321210330-4、4321210609-11、4321210823-12、4321220106-1、4321220327-9、4321220807-5、4321221031-10);R2A琼脂培养基、革兰染色液(广东环凯微生物科技有限公司,批号分别为1095241、230428A10,6106229、6107006、6107243、6108047、6109033);革兰阳性菌、革兰阴性杆菌、芽孢杆菌、酵母菌鉴定卡(法国bioMérieux公司,批号略);细菌16S rRNA V1-V3区扩增引物对16SV1F/16SV3R[1]155-156(深圳华大基因股份有限公司,批号为ZOP2107134150231);Taq HS Low DNA(宝日医生物技术有限公司,批号为AMG1533A);Nextera XT Index Kit、MiSeq Reagent Kit v3(美国Illumina公司,批号分别为20797547、20778646)。

1.2 方法

环境微生物收集:按2020年版《中国药典(四部)》9205药品洁净实验室微生物检测与控制指导原则和2020年版《中国药典(二部)》纯化水微生物限度检查法,连续4年(2020—2023年)收集某非无菌药品检验实验室中的B级表面微生物、五指手套表面微生物、沉降菌(每周1次动态监测),C级操作服表面微生物(每周1次动态监测),B/C/D级浮游菌(每季度1次)和纯化水系统关键取样点微生物(每月1次)。

生化鉴定:取收集到的B级环境微生物、C级操作服表面微生物TSA培养基及水系统微生物R2A培养基,按菌落形态接种各菌株至TSA培养基,33 ℃条件下培养、分离纯化,采用革兰染色法镜检,取相应鉴定卡,按自动化鉴定药敏仪操作规程进行生化鉴定。

基因鉴定:取收集到的C/D级环境微生物TSA培养基和水系统微生物R2A培养基,按每个取样点所有平板的菌落为1个样本接种至100 μL TE缓冲液中重悬,100 ℃水浴2.5 min,离心,取上清液,按高通量测序仪扩增子测序操作规程制备细菌16S rRNA V1-V3区扩增子文库检测细菌DNA基因组,利用I-Sanger MIDS分析系统分析测序数据,将获得的序列信息与美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库比对,判定菌种,并计算取样点中各菌种占比。

2 结果

2.1 实验区环境微生物鉴定

在药品微生物限度检查实验操作区,收集鉴定B级洁净台浮游菌、B级洁净台沉降菌、B级洁净台接触菌、五指手套和C级操作服胸口位置的环境微生物,共581株,菌株分布见图1。结果显示,未分离到浮游菌,几乎未见沉降菌,而表面微生物的检出频次较多,五指手套与操作服为主要的污染部位,洁净台接触菌一直维持在较

低水平，且2022年和2023年的检出频次少于2020年和2021年。根据革兰染色镜检初筛结果，实验操作区鉴定的菌株中，革兰阳性球菌占60.93%，革兰阴性杆菌占15.49%，芽孢杆菌占15.15%，霉菌占5.00%，酵母菌占2.07%，其他菌株占1.38%。

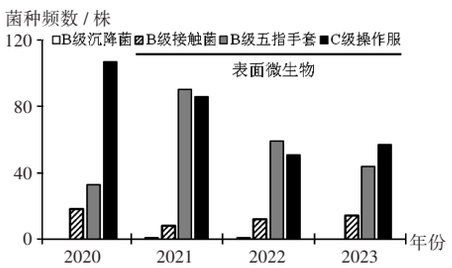


图1 2020—2023年药品微生物限度检查实验操作区环境菌鉴定结果统计

Fig. 1 Statistics of environmental bacteria identification results in the operation area of drug microbial limit testing experimental from 2020 to 2023

2.2 B级区环境微生物鉴定

280株相应区域收集的环境微生物中，生化鉴定为可接受及以上置信水平结果（概率85%～99%，2.5项同）的细菌和酵母有237株，共涉及29个属别和60个菌种结果，其中鉴定频数仅1株的属别和菌种分别占55.17%和50.00%。以鉴定频数由多到少排序（见表1，仅列出鉴定频数较多的10个属别和总计超过5株的菌种），污染B级区的环境微生物以葡萄球菌属（27.86%）、芽孢杆菌属（16.79%）和微球菌属（8.57%）较多，菌种为枯草芽孢杆菌/解淀粉芽孢杆菌/深褐芽孢杆菌（9.29%）、少动鞘氨醇单胞菌（8.21%）、人葡萄球菌人亚种（6.4%）和沃氏葡萄球菌（6.43%）较多。而洁净台接触菌中分离较多的为芽孢杆菌，五指手套中分离较多的为葡萄球菌。

2.3 C/D级环境微生物鉴定

监测包含20个C级检验区（实验背景区）取样点、30个C级缓冲区取样点和10个D级取样点。按2020年版《中国药典（四部）》细菌DNA特征序列测定法，于2023年7月至2024年1月选择细菌16S rRNA基因V1－V3进行扩增子测序，将拼接比对的鉴定结果与基因序列检测丰度对应，绘制鉴定热图（见图2，颜色越深提示丰度越高，下同）。结果显示，期间所有取样点的鉴定结果涉及13个菌种，表皮葡萄球菌和溶血葡萄球菌的检测丰度在所有检测区域内均最突出。C级缓冲区浮游菌监测点较多，收集鉴定的环境菌丰度和种类分布也较多，但除表皮葡萄球菌、人葡萄球菌人亚种和嗜根库克菌外的其他菌种均与B级区鉴定菌种不重复。

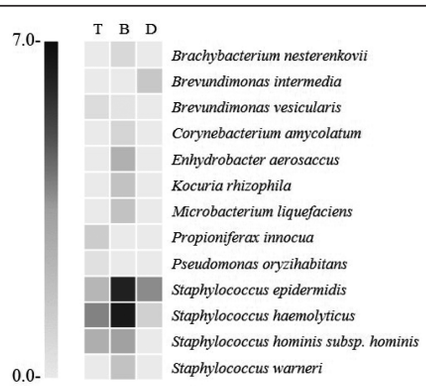
2.4 水系统微生物限度检查

定期在纯化水系统4个关键监测点取样，按

表1 B级区环境微生物鉴定结果（株）

Tab. 1 Results of environmental bacteria identification in Grade B area (strain)

种属	沉降菌	接触菌	五指手套
葡萄球菌属	1	10	67
Staphylococcus hominis ssp. hominis	1	2	15
Staphylococcus warneri	0	3	15
Staphylococcus epidermidis	0	2	13
Staphylococcus capitis	0	1	6
芽孢杆菌属	0	14	33
Bacillus subtilis / amyloliquefacieus / atrophaeus	0	6	20
微球菌属	0	3	21
Micrococcus luteus	0	2	12
Micrococcus luteus / lylae	0	1	9
鞘氨醇单胞菌属	0	4	19
Sphingomonas paucimobilis	0	4	19
库克菌属	1	4	17
Kocuria rosea	1	0	7
Kocuria kristinae	0	3	5
Kocuria varians	0	1	3
皮球菌属 / 皮肤球菌属	0	1	5
Dermacoccus nishinomiyaensis / Kytococcus sedentarius	0	1	5
根瘤菌属	0	1	4
假单胞菌属	0	2	2
地芽孢杆菌属	0	1	2
红酵母属 / 隐球菌属	0	0	3



T. C级检验区 B. C级缓冲区 D. D级区

图2 C/D级环境微生物鉴定热图

T. Grade C testing area B. Grade C buffer area D. Grade D area

Fig. 2 Heat map of environmental bacteria identification in Grade C / D area

2020年版《中国药典（二部）》纯化水各论检验微生物限度，结果显示，该水系统中可检出的需氧菌总数在2021年第3季度达峰值后逐渐减少（见图3）。基于关键监测点在水系统中的流经顺序为“总出→非洁净区→洁净区→总回”，微生物计数结果也呈现出随流动方向逐渐增多的趋势，但仅“总出”监测点的微生物总数与其他监测点有显著差异（$P < 0.001$），另外3个监测点之间微生

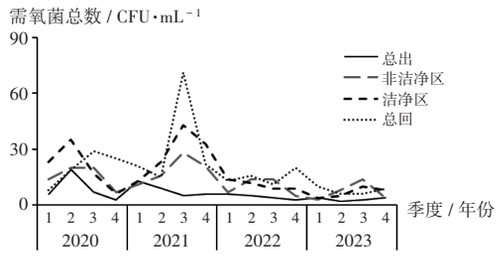


图3 纯化水系统微生物限度检查结果

Fig. 3 Results of microbiological limit examination in purified water system

物总数均无显著差异($P > 0.05$)。

2.5 水系统微生物鉴定

收集鉴定的水系统微生物共199株,各关键监测点微生物的总鉴定频数几乎一致,其中革兰阴性杆菌占73.87%,革兰阳性球菌占21.61%,芽孢杆菌占1.51%,酵母1.01%,无法培养的菌株占1.51%。可纯化培养的菌株经生化鉴定为可接受及以上置信水平结果的细菌和酵母共195株,共涉及27个属别和35个菌种结果,其中鉴定频数仅1株的属别和菌种分别占33.33%和40.00%。检出频次较高的微生物属别为鞘氨醇单胞菌属(42.56%)、甲基杆菌属(11.28%)、库克菌属(8.72%)、葡萄球菌属(7.18%)和微球菌属(5.13%),且鞘氨醇单胞菌属的鉴定菌种仅有少动鞘氨醇单胞菌,微球菌属仅滕黄微球菌。

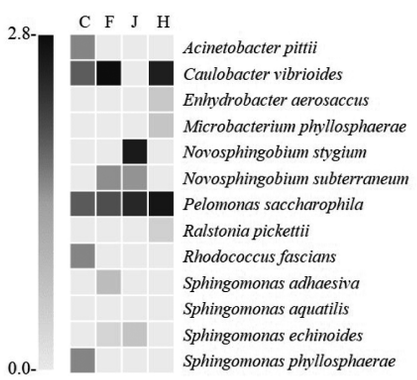
2023年7月至2024年1月生化鉴定的菌株见表2,结果显示,各监测点微生物的总鉴定频数几乎一致,但有48.3%的菌株被鉴定为少动鞘氨醇单胞菌*Sphingomonas paucimobilis*,且检出位置集中在水系统的洁净区和非洁净区使用端。

将上述半年期收集到的水系统微生物再根据2020年版《中国药典(四部)》细菌DNA特征序列测定法选择细菌16S rRNA基因V1-V3进行扩增子测序,绘制鉴定热图(见图4)。结果显示,嗜糖假单胞菌*Pelomonas saccharophila*在各监测点均有检出且丰度较高,在多个检测点丰度较高的菌种还有弧形茎菌*Caulobacter vibrioides*,洁净区丰度最高的菌种为冥河新鞘氨醇菌*Novosphingobium stygium*,而检出菌属中种类最丰富的为鞘氨醇单胞菌属*Sphingomonas*和新鞘氨醇菌属*Novosphingobium*。可见,在属水平的细菌鉴定上,生化鉴定与基因鉴定结果较一致。

表2 纯化水系统微生物鉴定结果(株)

Tab. 2 Results of environmental bacteria identification in purified water system (strain)

菌种	总出	非洁净区	洁净区	总回
Acinetobacter lwoffii	0	0	1	0
Aeromonas salmonicida	1	0	0	1
Pasteurella testudinis	0	1	1	0
Ralstonia pickettii	2	0	0	2
Rhodotorula glutinis	0	0	1	0
Sphingomonas paucimobilis	1	7	4	2
Staphylococcus saprophyticus	0	0	0	1
Staphylococcus xylosus	1	0	0	1
无鉴定结果	2	0	0	0
小计	7	8	7	7



C. 总出 F. 非洁净区 J. 洁净区 H. 总回

图4 纯化水系统微生物基因鉴定热图

C. Total output F. Non clean area J. Clean area H. Total return

Fig. 4 Heat map of environmental bacteria identification in purified water system

3 讨论

3.1 B级环境菌库的应用

B级操作区表面微生物与其他制药企业及检验实验室的洁净环境微生物监测结果类似,存在较多革兰阳性菌[5-7],主要为人体携带常见的葡萄球菌属和微球菌属菌种。芽孢杆菌和霉菌在该实验区域有一定的出现频率,但霉菌的检出位置大多在五指手套和操作服上,操作人员和检验样品应是主要污染源,芽孢与霉菌可能由于消毒剂效力或消毒频次不足导致的残留。因此,在非无菌药品检验的B级操作区,加强人员的污染控制意识和样品表面消毒程序非常必要(措施包括设置较高的洁净台表面清洁频率和选择适宜的杀孢子剂)。

值得关注的是,洁净室的温湿度、使用人员和水系统使用频率对微生物种类会产生重要影响[8]。在连续4年动态监测的表面微生物中出现过微生物检验控制菌项目的阳性菌种,包括4株铜绿假单胞菌,3株金黄色葡萄球菌和1株白色念珠菌。其中,铜绿假单胞菌出现在薄膜过滤法常用实验操作区,金黄色葡萄球菌出现在检验操作频次较高的实验操作区。这些菌种均属不可接受微生物,根据其检出频次,在具有特定功能和使用频率不一致的洁净实验室中,该实验室采用了有针对性的消毒程序,均能有效控制阳性菌种污染,未对检验造

成偏离结果。

3.2 C / D级环境菌库的应用

C / D级操作区洁净级别较低、空间较大，采用通量较高的二代测序技术能更快速全面地分析环境微生物分布情况。通过细菌16S rRNA基因V1－V3区鉴定法检出较多人体易携带的表皮葡萄球菌和溶血性葡萄球菌，特别是检验区几乎均为葡萄球菌属菌种，而其他检出的菌种大多分布在缓冲区域，与各企业提供调查的污染菌常见属种一致[9]，属于广泛分布在土壤、水、食物等环境中的常见菌，且均控制在较低水平。因此，在非无菌药品检验实验室的非关键区域，微生物污染仍主要源于操作人员的移动，需严格控制人员更衣和清洁程序，以降低洁净区域污染风险。

3.3 水系统菌库的应用

纯化水系统中监测微生物总数与洁净实验室内环境微生物鉴定频数相似，均呈现出自2021年达峰值后逐渐减少的变化趋势，分析原因可能与该实验室使用频率与检验数量变化有关。纯化水系统中革兰阴性菌较多，与企业制药用水系统的菌群分类占比相似[5,10]。生化鉴定显示，鞘氨醇单胞菌属占比最大，但基因鉴定显示，嗜糖假单胞菌和弧形茎菌为优势菌，同时包含多种鞘氨醇单胞菌属菌种，这些菌种均为水土环境中常见菌种。由于非洁净区纯化水主要用于配制培养基和消毒剂，进入洁净实验室前均需经过高压灭菌或过滤除菌，基本无污染风险。洁净区纯化水主要用于操作服和清洁用具清洗，仅限单独的洗衣间和洁具间，在正常使用情况下污染引入的风险较低。因此，这些菌种可作为洁净区域微生物污染的警戒菌种，一旦发现其在非水环境中出现，即可能存在环境失控的情况，且污染源来自纯化水系统。

3.4 二代测序技术的应用

制药企业无菌或非无菌洁净车间常采用VITEK生化鉴定或质谱鉴定的方式鉴定关键污染风险点的环境菌种。由于洁净环境的生长条件较严苛，分离培养得到的环境微生物表型会与典型特征不一致，导致没有鉴定结果或结果置信度低[11－12]，而利用基因鉴定的方法可弥补表型鉴定的不足。对于具有一定生物负载水平的洁净环境区域和水系统，本研究中采用了结合传统培养与二代测序的实验方法进行微生物鉴定，结果既能表明污染菌种的种类特征，又能反映每个独立区域的污染程度，同时目标菌株可被再培养与验证。虽然二代测序与生化反应在种水平的鉴定准确度不一致[13]，在单个菌株的溯源方面需结合多种鉴定手段综合评判，但在属水平上，二代测序的检测广度更宽，通量更大，效率更高。将二者结合进行环境微生物鉴定，非常适用于洁净级别较低、空间较大的洁净生产厂房或需要设置较多关键监测点的生物负载风险区域，一定程度上有效扩大微生物风险控制的监测范围，从更全面的微生物菌群信息中预期常见菌群，调查污染源，并进一步评估清洁、消毒和监测方法的有效性。

3.5 方法评价

本研究中通过分析洁净区域微生物群落的基础分布情况，一方面从趋势分析监控洁净区是否处于良好的受控状态，并从微生物群落的异常变化提示应进行相应的调查和措施；另一方面采取适宜的菌种保藏程序建立基础菌库，后续对污染微生物同源性的差异度分析可提供充分的溯源依据，在药品检验的质量控制体系中承担重要的数据支持。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020.
[2] 王似锦，余　萌，王杠杠，等. 制药企业洁净区环境监控与环境菌库的建设[J]. 中国医药工业杂志，2020，51(10)：1334－1340.
[3] SANDLE T，VIJAYAKUMAR R. Cleanroom microbiology [M]. Bethesda：Parenteral Drug Association，Inc.，2014：115－140.
[4] 高　程，郭良栋. 微生物物种多样性、群落构建与功能性状研究进展[J]. 生物多样性，2022，30(10)：168－180.
[5] 洪　亮，潘映秋，卢启寰，等. 基于多种微生物鉴定技术的制药企业环境微生物鉴定结果分析和应用研究[J]. 中国现代应用药学，2023，40(21)：3019－3026.
[6] 阎雅宁，曹晓云. 无菌药品生产企业微生物洁净室微生物污染的鉴定与结果分析[J]. 中国药品标准，2023，24(1)：45－51.
[7] 赵丽元，丁红雨，高洪霞，等. 环境微生物数据库的建立及在溯源分析中的应用[J]. 中国药业，2022，31(23)：84－88.
[8] 杨玲玲，李小燕，朱毅忠. 微生物洁净室环境菌库建立方法探讨[J]. 中国药事，2021，35(7)：763－767.
[9] 厉高懿，赵宇豪，杨　燕，等. 生物制品无菌制剂污染菌风险及无菌检查法培养条件调查[J]. 中国现代应用药学，2023，40(6)：840－847.
[10] 郭心怡，林　燕，曹长雷，等. 制药企业环境菌库建立的探讨[J]. 工业微生物，2023，53(2)：86－88.
[11] 张聪聪，毛腾霄，程　龙. 三家无菌制药企业洁净车间环境微生物的鉴定和群落分析[J]. 中国医药工业杂志，2021，52(6)：828－835.
[12] 郑小玲，王银环，曹　炜，等. 高风险注射剂生产企业制药用水系统微生物菌库的建立和分析[J]. 中国现代应用药学，2021，38(9)：1065－1068.
[13] 孙荣嵘，徐　晨，刘　洋，等. 二代测序用于药品微生物检测洁净区环境菌库的建立[J]. 中国合理用药探索，2022，19(10)：104－108.

（收稿日期：2024－06－25；修回日期：2025－02－07）