DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20180055

·综 述·

侵袭性肺曲霉病实验室检测方法的研究进展

宋一祎，李华茵*

复旦大学附属中山医院呼吸内科，上海 200032

［摘要］ 侵袭性肺曲霉病(invasive pulmonary aspergillosis，IPA)是指曲霉菌菌丝生长侵入肺实质而引起的感染性疾病，具有发病急性、进展迅速、病死率高的特点。长期中性粒细胞缺乏、血液系统恶性肿瘤发生、造血干细胞或实体器官移植、长期大剂量糖皮质激素或免疫抑制剂使用、遗传性或获得性免疫缺陷状态是感染侵袭性肺曲霉病的危险因素。早期诊断和及时治疗是良好预后的关键。但由于该病缺乏典型的临床表现，早期诊断尤为困难。传统的组织病理学、细胞病理学及分离培养的方法可以确诊 IPA，但灵敏度低。近年来，一些非培养实验室检测方法逐渐得到应用，如半乳甘露聚糖(galactomannan，GM)试验、(1,3)-β-D 葡聚糖(BDG)试验(G 试验)、聚合酶链反应(polymerase chain reaction，PCR)技术、免疫层析侧流装置(lateral-flow device，LFD)技术等，本文就此类检测方法诊断 IPA 作一综述。

［关键词］ 侵袭性肺曲霉病；诊断；聚合酶链反应；免疫层析侧流装置

［中图分类号］ R 446.6 ［文献标志码］ A

Research progress in experimental diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis

SONG Yi-yi, LI Hua-yin*

Department of Respiratory Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

［**Abstract**］ Invasive pulmonary aspergillosis (IPA) is an infectious disease caused by aspergillus species which can invade the tracheal bronchus and lung directly while hyphae grow. It is an acute, most often fatal, rapidly progressing infection. Prolonged neutropenia, hematological malignancy, transplantation (hematopoietic stem cell transplantation and solid organ transplantation), prolonged corticosteroid therapy and immunosuppressant therapy, acquired immune deficiency syndrome (AIDS), and inherited immunodeficiency are risk factors for this disease. Early diagnosis and timely treatment are the keys to a better prognosis. However, because of the unspecific clinical manifestations, it is challenging to diagnose the disease early. Traditional methods such as histopathology and cytopathology examinations and isolated culture are of confirmed value, but with low sensitivity. In recent years, a number of non-culture laboratory diagnostic methods are being applied into practice, for example, galactomannan assay, polymerase chain reaction, andlateral-flow device, this review is about these novel diagnostic methods.

［**Key Words**］ invasive pulmonary aspergillosis; diagnosis; polymerase chain reaction; lateral-flow device

侵袭性肺曲霉病(invasive pulmonary aspergillosis，IPA)是由曲霉菌侵入肺组织所引起的深部真菌感染性疾病，以发展成坏死性、出血性肺炎，形成多发性脓肿或肉芽肿，病灶边缘有小动脉栓塞为特征。致病菌主要有烟曲菌、黄曲菌、黑曲菌、土曲菌及构巢曲菌，其中以烟曲菌最为常见。IPA 主要发生于免疫抑制人群，常见的宿主有：>10 d 的中性粒细胞缺乏患者(中性粒细胞计数小于 0.5×10^9/L)；接受同种异体造血干细胞移植或实体器官移植患者；长期应用糖皮质激素患者(平均应用最小剂量相比泼尼松为 0.3 mg/kg/d，持续 3 周以上)；细胞免疫抑制疗法患者，如应用环孢素、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)阻滞剂、特异性单克隆抗体以及核苷类似物；遗传的免疫缺陷状态(慢性肉芽肿性疾病和严重的联合免疫缺陷病)或获得性免疫缺陷综合征(AIDS)患者[1]。这类患者占侵袭性肺曲霉病的 80%以上。

近年来，IPA 的发病率大大增加。有研究[2]显示，1978 至 1992 年，在院内经尸检证实的 IPA 患者比例从 9%升高至 32%；同时 IPA 死亡率也迅速上升，病死率达 80%，在器官移植患者中达 95%。该研究表明，早期诊断并及时开展抗真菌治疗可使侵

［收稿日期］ 2018-01-13 ［接受日期］ 2018-05-06

［作者简介］ 宋一祎，硕士生. E-mail：16211210068@fudan.edu.cn

*通信作者(Corresponding author). Tel：021-64041990；E-mail：lihuayin68@hotmail.com

袭性真菌病的生存率提高 80%以上，亟待解决的问题是找到一种能早期诊断且灵敏度高、特异度高的诊断方法。目前临床上主要采用欧洲癌症研究治疗组织及真菌研究组（EORTC/MSG）推荐的侵袭性真菌病的分级诊断标准[3]：确诊 IPA 有赖于组织病理学依据或正常无菌部位标本曲霉菌培养阳性或直接镜检阳性。临床诊断病例需要有宿主因素、临床依据和微生物学证据，其中根据是否有微生物学证据划分为 probable（很可能）IPA 和 possibie（可能）IPA。微生物学证据在 IPA 的诊断中至关重要，主要通过实验室检测获得，目前侵袭性肺曲霉病的实验室检测方法主要有半乳甘露聚糖（galactomannan，GM）试验、（1，3）-β-D 葡聚糖（BDG）试验（G 试验）、聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）技术、免疫层析侧流装置（lateral-flow device，LFD）技术及一些新兴的实验室检测方法[4-5]。本文就此类检测方法诊断 IPA 作一综述。

1　GM 抗原检测

GM 是曲霉菌细胞壁特异的组成部分，在曲霉菌侵犯组织早期可释放人血，并且这种抗原血症可持续 1～8 周。因此，GM 在血清中出现较早且存在时间较长，特异度和灵敏度相对较高，对 IPA 的早期诊断及治疗监测更有价值。GM 试验在粒细胞缺乏患者中的诊断价值被多项研究证实，文献[6-7]报道其诊断的灵敏度和特异度分别为 61%～89%和 84%～95%。而最近一项在非粒细胞缺乏患者中开展的研究[8]表明，血清 GM 试验诊断的灵敏度和特异度分别为 37.84%和 87.14%，支气管肺泡灌洗（bronchoalveolar lavage，BAL）液 GM 试验的灵敏度和特异度分别为 75.68%和 80.72%（当 ODI 值＞0.5 为阳性临界值时）。但 GM 试验目前存在的缺点在于：（1）GM 检测有假阳性干扰，如使用哌拉西林三唑巴坦后血清 GM 会出现阳性，可能与某些交叉反应有关。（2）其特异度和灵敏度波动范围大，并极大地依赖于测试的人群、检测标本的种类以及抗真菌药的使用，如血液恶性肿瘤患者或接受过造血干细胞移植的患者 GM 试验的灵敏度高于免疫功能正常的患者（可能与免疫正常宿主对侵入血管的曲霉菌清除有关）；使用经验性或预防性抗真菌药物治疗后 GM 试验的灵敏度降低；BAL 液与血清相比，GM 试验灵敏度更高。（3）尽管 GM 试验已经应用了很长时间，但其阳性结果的最佳临界值仍尚未确定，因此为临床应用带来了些许不足。目前较多研究[9-10]采用血清 GM 试验 ODI 值＞0.5、BAL 液 GM 试验 ODI 值＞1.0 作为阳性临界值，但也有少数研究[11]表明当 BAL 液 GM 试验 ODI 临界值为 0.8 时，具有最大的 ROC 曲线下面积（AUC）。

2　BDG 检测

BDG 是大部分真菌细胞壁的共同成分（接合菌、隐球菌除外），检测血循环或 BAL 液中的 BDG 可对系统性真菌感染进行筛查，此法灵敏度可达 1 ng/L，特异度高，有着极佳阴性预测值。近期的一项 Meta 分析[12]显示，G 试验在诊断真菌感染中的灵敏度和特异度分别为 77%和 85%。而 G 试验缺点在于：（1）无法区分真菌种类。（2）早期诊断意义不大，对抗真菌治疗患者进行连续监测，发现 BDG 在治疗中期才高浓度出现在血液中，所以 BDG 虽然可以监测病情变化和抗真菌治疗效果，但血液峰浓度出现较迟。（3）检测结果容易受多种因素影响，常见的干扰因素有应用纤维素膜进行的腹膜透析治疗，应用静脉制剂（白蛋白、免疫球蛋白等）、纱布或其他医疗物品（外科手术）及某些细菌败血症等。（4）某些曲霉菌种，如毛曲霉菌的细胞壁不含有 BDG，限制了 G 试验对该种曲霉的检测。

3　PCR 技术

PCR 是在体外模拟体内核酸复制从而获得大量目的基因的技术，于 20 世纪 90 年代开始应用于曲霉菌 DNA 检测，检测靶点主要包括曲霉核糖体 DNA（ribosomal DNA，rDNA）以及线粒体 DNA[13]。由于 PCR 反应具有灵敏度高，反应周期较传统培养、GM 试验短的特点，被认为是一种极有前景的诊断方法。然而，PCR 技术检测曲霉菌存在方法学标准化困难，对实验场地的配置、实验操作规范性、操作人员的要求较高，以及传统 PCR、巢式 PCR 技术存在容易污染样本，假阳性率高，不能量化等缺点，未能大规模应用。

实时荧光定量 PCR（real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction，RT-qPCR）的出现弥补了这一不足：RT-qPCR 是在传统 PCR 基础上加入信号系统达到实时监测 PCR 扩增的目的，继承了传统 PCR 高灵敏度和操作简便的特点，同时实现了对样本的定量检测。根据信号基团的不同，RT-qPCR 可以分为染料法和探针法[14]。非

特异的染料法成本较低，但面临着类似于普通 PCR 非特异性扩增产物干扰的假阳性问题；探针法中使用的探针多是 TaqMan 探针，与染料法相比，假阳性出现概率更低[15]。此外，欧洲曲霉 PCR 行动委员会（European aspergillus PCR initiative, EAPCRI）关于曲霉 DNA 提取方式、PCR 扩增方案、样本种类及数量、反应条件和体系等的标准化操作建议不断被完善[16-17]，例如推荐当使用全血标本时应使用≥3 mL 全血，需先裂解红细胞和白细胞；提取 DNA 所用的洗脱液应小于 100 μL，并设置阳性对照和阴性对照等。

2014 年，Arvanitis 等[18]发表了一项包含 25 项研究、2 595 个病例的 meta 分析，旨在评价 PCR 技术在高危血液系统疾病患者血液样本（包括全血和血浆）中的诊断价值，结果显示：PCR 诊断试验在血液样本中的灵敏度和特异度分别为 84%和 76%；当同一患者至少 2 个样本 PCR 试验阳性时，阳性似然比为 12.8。2016 年，Imbert 等[19]研究证实了这一结论，该研究纳入了来自 941 例患者（其中 51 例患者被诊断为确诊/很可能 IPA）的 5 146 个血清样本，结果表明血清 PCR 阳性诊断 IPA 的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 66.7%、98.7%、75.6%和 98.0%，与血清 GM 试验相比，PCR 试验受粒缺和非粒缺因素影响更小，假阳性率更低。在疾病监测方面，当样本 DNA 载量以 150 拷贝/mL 为临界值时，对患者 90 d 死亡率可能性高低具有很好的区分价值。该研究还发现，当结合 GM 试验和 PCR 试验（二者之一阳性即为阳性标准）时，诊断 IPA 的灵敏度可高达 88.2%。

PCR 试验在 BAL 液中的灵敏度被认为比血液标本中更高，与之相关的机制可能是：(1)BAL 液标本是从病灶邻近处获取，因此曲霉菌载量更高。(2)从曲霉初始感染至入侵肺泡毛细血管壁往往需要 24 h 左右，因此 BAL 液检测相比于血液学检测更有利于早期诊断[20]。在一项包含了 116 例患者的多中心的回顾性临床研究[21]中，发现 PCR 诊断试验在 BAL 液中的灵敏度和特异度分别为 78%和 79%，其灵敏度结果与 2007 年的一项关于 PCR 在 BALF 中诊断价值的 meta 分析[22]结果相近（灵敏度 79%，特异度 94%），然而特异度却有所下降，可能与使用巢式 PCR 法、样本被污染、无法区分是定植或感染有关。而 2016 年的一项采用 RT-qPCR 法检测 BAL 液中曲霉菌的研究[23]表明，在 BAL 液样本中，qPCR 和 GM 试验都具有良好的灵敏度（90% *vs* 90 %）；但是 qPCR 的特异性明显高于 GM 试验（92.5% *vs* 68.8%，$P<0.001$）。分析这一结果与前者不同的原因在于，由于实现了实时荧光定量，原始样本的 DNA 拷贝浓度与最后的荧光循环阈值（ct）值相关，从而可以更好地区分定植与感染。由此可见，当使用设计良好、试验过程精确定量的 qPCR 方法来检测曲霉 DNA 时，无论其灵敏度和特异性均优于 GM 试验。

此外，PCR 技术目前也可用于活检组织的曲霉 DNA 检测，是对传统组织培养及镜检的一种补充性诊断方法，并且有助于真菌种属的鉴别[24-25]。关于 PCR 技术在胸腔积液、痰液等体液标本中的诊断价值相关文献报道甚少，有待进一步研究。

4 LFD 技术

2008 年，Thornton[26]利用烟曲霉的冻干菌丝免疫小鼠，制备了一株单克隆抗体 MAb JF5，其针对的抗原是一种糖蛋白，该体外研究表明，该糖蛋白在曲霉快速活跃生长期连续分泌，其主要分布在菌丝细胞壁、胞间隔和围绕细胞的荚膜层中。LFD 是利用该抗体研发的一种快速诊断 IPA 的免疫层析侧流装置，为胶体金颗粒标记的 MAb JF5 作为检测试剂加载到胶体金结合垫上，同时未标记的 MAb JF5 被固定在硝酸纤维膜的捕获区。血清或 BAL 液中的抗原加入样品垫后，由于虹吸作用向前移动，首先与金标抗体结合，胶体金-抗体-抗原复合物移动到捕获区，再与固定的 MAb JF5 结合，形成一条肉眼可见的红线，显色强度与抗原浓度成正比，检测结果被判为阴性、弱阳性、中等阳性或强阳性。测试结果在加样后 10～15 min 后即可观测。

2012 年 12 月至 2013 年 5 月，Hoenigl 等[27]收集了来自澳大利亚和德国两所教学医院的 78 个病例（具有 IPA 的危险因素），采集了 78 份 BAL 液样本，结果显示 LFD 试验诊断的灵敏度和特异度分别为 80%和 95%，阳性预测值（PPV）和阴性预测值（NPV）也分别为 80%和 95%，诊断优势比为 78。然而在随后开展的一项自 2013 年 5 月至 2014 年 12 月的研究[28]中，对来自 72 例患有血液系统肿瘤患者的 95 份 BAL 液样本进行了分析，发现 LFD 的灵敏度、特异度、PPV 和 NPV 分别为 71%、76%、35%和 94%。分析 LFD 试验的灵敏度有所下降可能与纳入人群的特点有关（前者在收集 BAL 液的同时较少受抗真菌治疗的影响）。此外，类似于 PCR 试验，当结合 BAL 液的 GM 试验和 LFD 试验作为

联合诊断措施时，IPA 的灵敏度可达 94%，特异度可达 93%，诊断优势比可达 219[29-30]。由此看来，LFD 试验具有简便、快速的特点，且诊断价值较好，尤其具有良好的阴性预测价值。

关于 LFD 的 IPA 诊断价值还存在许多亟待解决的问题。首先，LFD 是定性试验，阳性结果判读完全依赖操作人员的主观评估，可能会造成结果的偏差；其次，目前关于 LFD 的研究检测样本仅限于血液和 BAL 液，没有对尿液等其他体液进行检测，而且上述实验还未经大量临床样本验证；最后，关于 LFD 试验的商业化检测目前还存在困难。因此，LFD 在临床上应用的推广还需进一步的探讨。

5　其他诊断方法

5.1　醋酸镰孢氨酸 C（triacetylfusarinine C，TAFC）　TAFC 是烟曲霉菌在感染宿主后转运铁过程中产生的一种分泌型的小分子螯合剂。在一项包含 44 个 BAL 液样本的研究[31]中，TAFC 检测的灵敏度、特异度、PPV、NPV 分别为 40%、79%、50%和 72%。但当结合 TAFC 和 GM 试验结果时，其诊断 IPA 的灵敏度可达 87%。但由于 TAFC 在其他一些真菌（镰孢菌的成熟期）也可检测到，因而不具有曲霉特异性。此外，关于这种新型标志物最佳临界值以及在其他体液标本中的表现等需要后续更多的研究来证实。

5.2　二甲硫基胶霉素（bis-methylthio gliotoxin，bmGT）　胶霉毒素作为烟曲霉产生的真菌毒素之一，对哺乳动物细胞具有免疫抑制及促凋亡作用。其通过抑制 NAPDH 氧化酶活性进而抑制粒细胞抗微生物作用。在侵袭性曲霉病动物模型和临床确诊患者血清中均可检测到胶霉毒素，预示其可作为曲霉病诊断指标。而 bmGT 是胶霉素甲基化产生的一种更为稳定的代谢产物。Vidal-García 等[32]做了一项来自 90 例高危患者的 357 个血清样本检测，发现血清 bmGT 的灵敏度、特异度、PPV、NPV 分别为 61.5%、93.0%、25.0%和 98.5%，与 GM 试验相结合时，PPV 和 NPV 分别可达 100% 和 97.5%。是一种颇有前景的血清标志物，但仍需大量研究证实。

5.3　电子鼻（eNose）　eNose 是动物嗅觉系统研究成果、传感器技术与电子学和计算机技术结合的产物，主要由具有部分选择性的传感器阵列和模式识别系统组成，是一种通过传感器的部分专一性和系统的模式识别功能，来检测简单或复杂气味的电子仪器。其广泛用于生物的鉴别、药物的分类与判别。临床上，eNose 可通过分析呼出气中包含的各种挥发性有机化合物的不同从而鉴别不同的肺部疾病，数分钟内即可得出结果。Heer 等[33]开展的一项单中心、前瞻性研究中，包含了 46 例受试者，结果显示，交叉验证后的 eNose 诊断的灵敏度和特异度分别为 100%和 83.3%。AUC 为 0.93。该研究存在的问题是，样本量太小，需要进一步加大样本量来验证这一结论；其次，eNose 得到的信息代表所测样品中全部挥发物的总体分布，而不是常规仪器的分析测得的某种或某几种具体组成的含量，无法区分是曲霉感染后产生的哪一种或哪几种气体导致了气体指纹的不同；另外，电子鼻价格昂贵，从“台式”到“手持式”价格也从一万美元至十多万美元不等。

5.4　呼出气冷凝液（exhaled breath condensate，EBC）试验　EBC 试验实际上也是检测 EBC 中的 GM 含量，相较于检测 BAL 液的 GM 试验而言，创伤更小。但是其检测效果还不能确定。最近由 Bhimji 等[34]开展的一项在肺移植者中进行的前瞻性研究表明，相对于健康人，患者 EBC 中的 GM 含量更高（$P<0.0001$）。然而，检测 EBC 中的 GM 未能得出一个有效的界定值（AUC 只有 0.46）。并且该研究还发现，EBC 中 GM 试验和同时采集的 BAL 液中 GM 试验的结果并无相关性。

5.5　质谱分析法　真菌在感染宿主细胞的过程中会产生一系列真菌毒素，其中最具有杀伤力的是一种被称为真菌铁载体的蛋白。基质辅助-激光解吸电离质谱分析法可以检测血液、尿液以及肺组织中此种蛋白的含量，检测极限可达到 0.28～0.36 ng/mL，特别是在组织标本中检测这种由真菌代谢产生的物质，可减少由直接镜检得出的假阳性结果。这种检测方法具有很好的应用前景，但目前缺少在人群研究中的证实。

6　小　结

IPA 的早期诊断仍然是临床上的一个难题。传统的真菌培养及显微镜检查方法是确诊曲霉菌感染的金标准，但由于其阳性率低，培养周期长已经不适合临床工作；而 GM 试验已得到广泛应用，且被 EORTC/MSG 纳入微生物学证据之一，肯定了其诊断 IPA 的价值，但存在易受患者疾病状态影响、抗真菌疗法干扰及某些药物影响的不足。此外，qPCR 及 LFD 同样具有不低于 GM 试验的诊断

价值,且操作更简便,诊断时间更短,有利于指导及监测抗真菌治疗,但由于存在标准化操作流程尚未统一、最佳临界值无法确定及商业化试剂的缺乏等缺点,限制了在临床上的应用。一些新兴诊断方法为 IPA 的诊断提供了思路,但仍需要更多相关研究证实。结合多种试验可以显著提高 IPA 的诊断效率,这一结论已经在多项研究中得到证实,为后续的研究及临床应用提供了方向。

参考文献

[1] 曹江红,李光辉. 侵袭性真菌病修订定义——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)共识组[J]. 中国感染与化疗杂志, 2008,8(5):321-324.

[2] GROLL A H, SHAH P M, MENTZEL C, et al. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital[J]. J Infect, 1996,33(1):23-32.

[3] DE PAUW B, WALSH T J, DONNELLY J P, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for research and treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group[J]. Clin Infect Dis, 2008,46(12):1813-1821.

[4] SWOBODA-KOPEĆ E, SIKORA M, PISKORSKA K, et al. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis[J]. Adv Exp Med Biol, 2017,944:27-33.

[5] MCCARTHY M W, WALSH T J. Special considerations for the diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillosis[J]. Expert Rev Respir Med, 2017, 11(9): 739-748.

[6] KAZIANI K, MITRAKOU E, DIMOPOULOS G. Improving diagnostic accuracy for invasive pulmonary aspergillosis in the intensive care unit[J]. Ann Transl Med, 2016,4(18):352.

[7] VERGIDIS P, RAZONABLE R R, WHEAT L J, et al. Reduction in false-positive aspergillus serum galactomannan enzyme immunoassay results associated with use of piperacillin-tazobactam in the united states [J]. J Clin Microbiol, 2014,52(6):2199-2201.

[8] ZHOU W, LI H, ZHANG Y, et al. Diagnostic value of galactomannan antigen test in serum and bronchoalveolar lavage fluid samples from patients with nonneutropenic invasive pulmonary aspergillosis[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(7):2153-2161.

[9] MORRISSEY C O, CHEN S C, SORRELL T C, et al. Galactomannan and PCR versus culture and histology for directing use of antifungal treatment for invasive aspergillosis in high-risk haematology patients: a randomised controlled trial[J]. Lancet Infect Dis, 2013,13(6):519-528.

[10] BRETAGNE S, MARMORAT-KHUONG A, KUENTZ M, et al. Serum aspergillus galactomannan antigen testing by sandwich ELISA: practical use in neutropenic patients[J]. J Infect, 1997,35(1):7-15.

[11] LEEFLANG M M, DEBETS-OSSENKOPP Y J, VISSER C E, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2015(12):CD007394.

[12] KARAGEORGOPOULOS D E, VOULOUMANOU E K, 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.

[13] DONNELLY J P. Polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis: getting closer but still a ways to go[J]. Clin Infect Dis, 2006,42(4):487-489.

[14] 姜文灿,岳素文,江 洪,等. TaqMan 探针法实时荧光定量 PCR 的应用和研究进展[J]. 临床检验杂志(电子版), 2015,4(1):797-805.

[15] 欧阳松应,杨 冬,欧阳红生,等. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用[J]. 生命的化学, 2004,24(1):74-76.

[16] WHITE P L, MENGOLI C, BRETAGNE S, et al. Evaluation of aspergillus PCR protocols for testing serum specimens[J]. J Clin Microbiol, 2011,49(11):3842-3848.

[17] PASQUALOTTOA C, FALCI D R. Has aspergillus PCR come to the age of maturity? [J]. Mycopathologia, 2016, 181(9-10):623-624.

[18] ARVANITIS M, ZIAKAS P D, ZACHARIOUDAKIS I M, et al. PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance[J]. J Clin Microbiol, 2014,52(10):3731-3742.

[19] IMBERT S, GAUTHIER L, JOLY I, et al. Aspergillus PCR in serum for the diagnosis, follow-up and prognosis of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients[J]. Clin Microbiol Infect, 2016,22(6):562.

[20] PAHOLCSEK M, FIDLER G, KONYA J, et al. Combining standard clinical methods with PCR showed improved diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and prolonged neutropenia[J]. BMC Infect Dis, 2015,15:251.

[21] HENG S C, CHEN S C, MORRISSEY C O, et al. Clinical utility of aspergillus galactomannan and PCR in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with haematological malignancies[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014,79(3): 322-327.

[22] TUON F F. A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples[J]. Rev Iberoam Micol, 2007,24(2):89-94.

[23] ZHANG S, WANG S, WAN Z, et al. Quantitative real-time PCR and platelia galactomannan assay for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: bronchoalveolar lavage fluid performs better than serum in non-neutropaenic patients[J]. Mycopathologia,2016,181(9-10): 625-629.

[24] BUITRAGO M J，AGUADO J M，BALLEN A，et al. Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease[J]. Clin Microbiol Infect，2013，19(6)：E271-E277.

[25] REINWALD M，SPIESS B，HEINZ W J，et al. Aspergillus PCR-based investigation of fresh tissue and effusion samples in patients with suspected invasive aspergillosis enhances diagnostic capabilities[J]. J Clin Microbiol，2013，51(12)：4178-4185.

[26] THORNTON C R. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis[J]. Clin Vaccine Immunol，2008，15(7)：1095-1105.

[27] HOENIGL M，PRATTES J，SPIESS B，et al. Performance of galactomannan，beta-D-glucan，aspergillus lateral-flow device，conventional culture，and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis[J]. J Clin Microbiol，2014，52(6)：2039-2045.

[28] PRATTES J，LACKNER M，EIGL S，et al. Diagnostic accuracy of the aspergillus-specific bronchoalveolar lavage lateral-flow assay in haematological malignancy patients[J]. Mycoses，2015，58(8)：461-469.

[29] EIGL S，PRATTES J，LACKNER M，et al. Multicenter evaluation of a lateral-flow device test for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in ICU patients[J]. Critical Care，2015，19(1)：178.

[30] JOHNSON G L，SARKER S J，NANNINI F，et al. Aspergillus-specific lateral-flow device and real-time PCR testing of bronchoalveolar lavage fluid：a combination biomarker approach for clinical diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis[J]. J Clin Microbiol，2015，53(7)：2103-2108.

[31] ORASCH T，PRATTES J，FASERL K，et al. Bronchoalveolar lavage triacetylfusarinine C (TAFC) determination for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies[J]. J Infect，2017，75(4)：370-373.

[32] VIDAL-GARCÍA M，DOMINGO M P，DE RUEDA B，et al. Clinical validity of bis(methylthio) gliotoxin for the diagnosis of invasive aspergillosis[J]. Appl Microbiol Biotechnol，2016，100(5)：2327-2334.

[33] DE HEER K，VAN DER SCHEE M P，ZWINDERMAN K，et al. Electronic nose technology for detection of invasive pulmonary aspergillosis in prolonged chemotherapy-induced neutropenia：a proof-of-principle study[J]. J Clin Microbiol，2013，51(5)：1490-1495.

[34] BHIMJI A，BHASKARAN A，SINGER L G，et al. Aspergillus galactomannan detection in exhaled breath condensate compared to bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised patients[J]. Clin Microbiol Infect，2018，24(6)：640-645.

［本文编辑］ 叶　婷