

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.06.042

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.06.042>

侵袭性肺曲霉病检测方法进展

马欣雨 综述 于世寰 审校

(哈尔滨医科大学附属第一医院呼吸科, 哈尔滨 150001)

[摘要] 烟曲霉是导致侵袭性肺曲霉病(invasive pulmonary aspergillosis, IPA)的主要致病菌。免疫功能低下的患者更容易发生这种病变,且病死率很高。早期、准确的诊断和治疗对于患者的预后至关重要。目前用于检测这种真菌感染的诊断方法是常规真菌学检查(直接显微镜检查,组织学检查和培养)、影像学、非培养基检测半乳甘露聚糖和(1,3)- β -D-葡聚糖和细胞外糖蛋白以及基于PCR的分子检测等。上述方法的灵敏度和特异性较低,有待开发新的诊断工具和方法,以提高高危患者侵袭性肺曲霉病的快速诊断。

[关键词] 侵袭性肺曲霉病;检测方法;荧光原位杂交

Progress in detection methods of invasive pulmonary aspergillosis

MA Xinyu, YU Shihuan

(Department of Respiratory Medicine, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract *Aspergillus fumigatus* is the major causative agent of invasive pulmonary aspergillosis (IPA). Patients with low immune function are more likely to develop this disease with a high mortality rate. Early, accurate diagnosis and treatment are critical to the patient's prognosis. The current diagnostic methods for detecting this fungal infection are conventional mycological examination (direct microscopy, histological examination and culture), imaging, non-media detection of galactomannan, $\beta(1,3)$ -glucan sugar and extracellular glycoproteins, as well as PCR-based molecular detection, but the sensitivity and specificity of appeal methods are low, so new diagnostic tools and methods have been developed to improve the rapid diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in high-risk patients.

Keywords invasive pulmonary aspergillosis; detection methodologies; fluorescence in situ hybridization

曲霉属有近200种,对公众健康有很大影响^[1-2]。由于其在工业食品生产和制药领域具有丰富的酶学特性,因此有些物种被良好地使用^[3]。但是有些物种对人类和其他动物有害,导致感

染。在曲霉菌的致病菌中,烟曲霉是导致人类感染的主要因子^[4-6]。免疫功能低下的患者,包括造血干细胞移植、实体器官移植、长期中性粒细胞减少症、皮质类固醇使用、人类免疫缺陷病毒(艾

收稿日期 (Date of reception): 2019-07-02

通信作者 (Corresponding author): 于世寰, Email: Yushihuan2000@126.com

滋病毒)、遗传性免疫缺陷疾病(慢性肉芽肿病)更易导致真菌感染^[7-8]。侵袭性肺曲霉病(invasive pulmonary aspergillosis, IPA)是曲霉菌相关肺部感染中最具破坏性的一种^[1]。尽管真菌感染的发生率很低,但发病率和病死率很高,据报道^[1]:IPA患者病死率为35%~80%。IPA高病死率主要是由晚期诊断和治疗不足引起的。目前可用的诊断试验的灵敏度和特异性较低,造成了微生物检测的延迟^[9]。鉴定属的水平并不困难,鉴定物种水平可能更具挑战性。因此,开发和实施更快、更准确的检测方法非常重要。目前传统方法中的大多数都没有检测到烟曲霉菌种,只允许鉴定曲霉属。荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)的分子方法是实现该目的的良好替代方案。

1 IPA 的诊断方法

欧洲癌症研究和治疗组织/侵入性真菌感染合作组(European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group, EORTC)和国家过敏和传染病研究组真菌病研究组(National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group, MSG)为侵袭性真菌感染(invasive fungal infection, IFI)的诊断创建了标准定义。根据EORTC/MSG指南,IFI有3个概念水平,即经确诊的IFI、临床诊断的IFI和拟诊的IFI。经确诊的IFI诊断与观察曲霉属菌的菌丝特征有关。在组织学或直接显微镜检查样品和通过不同部位的培养分离曲霉属菌种。IFI的临床诊断由宿主危险因素与临床和真菌学信息的关联来定义。IFI的拟诊仅基于患者的临床症状和危险因素而没有真菌支持。IPA生物标志物,例如半乳甘露聚糖(galactomannan, GM)和(1,3)- β -D-葡聚糖(BDG),部分包括在微生物诊断标准中。然而,EORTC/MSG定义仍然主要依赖于传统的实验室方法(组织学和培养方法)。尽管临床证据^[2]表明在IPA的诊断中使可用分子方法,但由于缺乏方案标准化,尚未包括在EORTC/MSG定义中。

2 常规真菌学检查

曲霉属的直接显微镜检查和肺活检的组织学检测,提示曲霉属的真菌形态学特征是存在透明和有隔膜的菌丝,具有45°角的二分支和均匀宽度(3~6 μ m)。在直接显微镜检查中,不可能区分曲

霉属。在Hayden等^[10]的一项关于活检的组织学观察研究中,镰孢属、博氏假孢属和曲霉菌属有相同形态外观,不可能通过其形态来区分这3种微生物,因此这些真菌通常被鉴定为曲霉属。这种无法将曲霉属物种与其他生物体区分开来的情况影响了曲霉属物种在组织学检测方法的特异性。在培养方法中,通常可以根据菌落形态和颜色推断出分离物的鉴定。烟曲霉形成具有棉质纹理的绿蓝色或灰蓝色的菌落。然而为了明确鉴定,必须详细观察分生孢子的形态和个体发育^[1]。由于难以区分不同真菌物种的形态,因此在直接显微镜检查和活检的组织学观察中鉴定曲霉属是主观的且具有挑战性的。通过培养方法对菌落的正确识别也取决于分析者的知识和经验。

3 影像学检查

影像学检查,特别是胸部计算机断层扫描(CT),在肺浸润的早期检测方面是敏感的,但是放射学特征不是真菌感染的特异性表现^[11]。影像学检查无法识别导致感染的真菌类型。文献^[1,7,11]评估了IPA患者胸部CT的影像学表现,通常表现为磨玻璃影、实变、晕轮征、结节、肿块,反向晕征或环状征、“空气新月”征等。晕轮征的典型特征是由磨玻璃混浊所包围的实心结节,曲霉菌侵入血管及以后在小动脉(有时为肺大血管)内的血栓形成,继而发生出血性肺梗死,中央的结节或肿块为坏死的肺组织,周围的晕环则代表坏死周围出血区。因为晕轮征在疾病过程的早期发生且存在时间短,除非在第1周内进行影像学检查,否则不会见到,因此在早期影像学有这种改变的时候也需考虑IPA。但晕轮征不是侵袭性曲霉病所特有的,恶性肿瘤、血管炎、组织性肺炎和其他非典型感染也存在。反向晕征或环状征(见于<1%的血管侵袭性曲霉病患者)在放射学上表现为磨玻璃混浊的中心区域,周围被致密的实变包围,该征象是非特异性的,可见于其他肺部病理,包括组织性肺炎、肺梗塞和肉芽肿性疾病。侵袭性曲霉病的“空气新月”征反映了真菌的菌丝侵犯肺部血管导致肺出血、动脉栓塞致梗死,中心形成坏死结节,之后中心梗死组织收缩,周围坏死组织吸收形成薄壁空洞,曲霉菌球寄生在空洞病变内,当空气填充于曲霉菌球与薄壁空洞之间的间隙,即形成空气新月征。近50%的患者可有这种影像学改变,标志着患者免疫力的恢复(通常在发病后2周可见)^[11]。胸部

CT具有简单、快速、无创等有点, 如果临床怀疑IPA, 它将是首选的检测手段。

4 非培养检测

4.1 GM 抗原检测

GM是曲霉和青霉细胞壁多糖, 当菌丝生长时, GM从薄弱的菌丝顶端释放, 是最早释放的抗原。使用夹心酶免疫分析(sandwich enzyme immunoassay, EIA)技术(Platelia Aspergillus EIA; Bio-Rad, Marnes la Coquette, France)检测GM抗原, 根据美国指南(IDSA), 如果血清和支气管肺泡灌洗液(broncho-alveolar lavage fluid, BALF)中的cut-off值 ≥ 0.5 , 则结果被认为是阳性的。目前, 国内外对于GM试验阳性界值仍难统一, 欧洲普遍使用0.5~1.0, 美国则为0.5。为减少试验的假阳性及假阴性, 我国侵袭性真菌感染(invasive fungal infection, IFI)指南将连续2次GM阳性作为微生物感染的标准。有研究^[12]指出: GM被认为是筛选IPA的可靠标志, 也可用于预测IPA患者的预后。GM检测的临床应用在血清/全血和BALF中得到认可和验证, 与真菌学检测相比, 其阳性可更快地获得, 因此可以更早地开始适当的抗真菌治疗^[13]。BALF应该更敏感, 因为它是在真菌发生的地方进行取样, 且肺泡灌洗液中GM阳性率受抗真菌治疗和中性粒细胞计数的影响小于血样, 所以支气管肺泡灌洗液样品中GM的测定显著提高了真菌诊断的准确性。由于有效的抗真菌治疗持续降低生物标志物水平和真菌检测的可能性, 且饮食中的转基因污染及阿莫西林和氨苄青霉素治疗会导致假阳性结果, 因此进行支气管镜检查的时间点至关重要^[2]。Zedtwitz-Liebenstein等^[14]指出: 尿素具有低分子量, 它迅速扩散到肺泡内。肺尿素与血浆尿素氮保持相对稳定, 尿素在生理pH值下没有净电荷, 不在肺内生成、代谢、浓缩, 极易检测, 并可以通过尿素校正肺泡灌洗液细菌计数以提高诊断率。经尿素校正的肺泡灌洗液GM检测可消除灌洗量、灌洗过程等灌洗因素对肺泡灌洗液GM的稀释影响。目前已有针对IPA的新型生物标志物的相关研究^[15], 如Pentraxin 3(PTX3)为正五聚蛋白超家族成员之一, 在炎症部位局部合成, 通过结合曲霉表面GM及酵母聚糖发挥作用, 是一种宿主防御曲霉菌的重要的分子, 该促炎物质在IPA患者中往往显著升高, 有助于鉴别曲霉菌是否感染还是定植, 或BALF中GM实验是否为假阳性结果。

4.2 BDG 测定

葡聚糖广泛存在于真菌细胞壁, BDG占真菌细胞壁成分的50%以上, 是真菌细胞壁上的特有成分。BDG测定利用与血清内毒素测定相同的原理, 使用马蹄蟹底物测量G因子的活化。血清真菌BDG测定基于分光光度计读数, 其中光密度(OD)转换为BDG浓度, 结果被解释为阴性(范围 < 60 pg/mL), 不确定(60~79 pg/mL), 或阳性(> 80 pg/mL)^[16-17]。但BDG检测不是曲霉菌特有的, 念珠菌病、隐球菌病、卡氏肺孢子虫等均可呈阳性。研究^[2]显示: 静脉内给予白蛋白和免疫球蛋白或血液透析时可以提高体内BDG水平。

4.3 曲霉菌侧向流动装置

最近有研究者^[18]开发了用于检测在曲霉属菌种生长过程中分泌的细胞外糖蛋白的侧向流动装置(lateral flow device test, LFD), 将其命名为曲霉菌LFD(OLM Diagnostics, Bath Lane, Newcastle upon Tyne, UK)。LFD测试代表一种有前途的GM测定替代方法, 是一种免疫层析点检测试验, 可检测在曲霉菌种活跃生长过程中分泌的细胞外甘露糖蛋白抗原。与GM检测相比, LFD具有以下优势: 1) LFD操作简易, 无需专业的实验室设备或经过专门培训的人员; 2) LFD可在10~15 min内显示结果; 3) 用于抗原检测的单克隆JF5抗体仅与来自某些青霉属物种的抗原交叉反应, 而不与GM-酶免疫检测到的许多其他致病真菌交叉; 4) 如IPA动物模型所示, BALF LFD对系统性AFs的影响不强; 5) BALF LFD测试报告了其他有患IPA风险的患者群体的高准确性, 且测试成本相对较低。但是由于这个测试是用肉眼阅读的, 因此对这个测试的解释具有主观性^[19]。

5 PCR

用于诊断IPA的分子方法之一是PCR。目前, 最常用的是实时PCR。该方法可应用于多种临床样本, 即血清、血浆、血液、支气管肺泡灌洗液、痰液、脑脊液和活组织^[20-22]。

基于实时PCR的真菌检测分析具有几个优点, 如高灵敏度和物种水平鉴定且比传统的培养方法更快。尽管该检测方法具有令人满意的特异性、灵敏度、阳性预测值(positive predictive value, PPV)和阴性预测值(negative predictive value, NPV), 但由于检测方法的多样性, 缺乏标准化方

案, 阻碍了该技术在医院常规中的实施^[22-23]。

引物、PCR形式、待分析样品的类型和数量以及DNA提取方法等参数可影响PCR性能。在样品处理过程中, 存在交叉污染的风险以及样品中具有PCR抑制物质的风险^[24]。为寻找这个问题的解决方案, 目前已经开发了具有内部扩增对照的基于PCR的诊断测定, 如MycAssay™曲霉菌属。内部扩增对照用于检测样品中可能存在的PCR抑制剂, 可以排除抑制导致假阴性结果^[25]。

6 挥发性化合物检测

被曲霉菌感染的个体呼出挥发性有机化合物可被检测到。这些化合物在曲霉病患者中具有容易获得且快速鉴定的潜力。用于诊断肺曲霉病的呼吸测试具有一定的优势, 因为样本接近病变部位, 且标本易获得。呼出的挥发性有机化合物中的2-戊基呋喃(2PF)可作为曲霉菌感染的标志。有研究^[22]采用这种技术, 发现敏感性和特异性均为80%~100%。然而需要进一步的研究以更好地了解在不同人群中的测试性能以及与抗真菌药或其他药物相互作用。

7 醋酸镰孢氨酸 C

Ho enigl等^[26]提出: 醋酸镰孢氨酸 C (Triacetylfusarinie C, TAFC)是一种真菌铁载体, 在动物模型中, 可在尿液中积聚, 是诊断IA的潜在新生物标志物。TAFC是由烟曲霉分泌产生的2种不同的铁载体(即低分子量铁, 铁特异性螯合剂)之一, 在感染过程中从宿主中获取铁, 首次提供了人尿中TAFC发生的证据。尿液中的TAFC/肌酐指数测定有助于IA诊断结果, 具有无创取样的优点, 其敏感性和特异性与报道的血清和支气管肺泡灌洗中的GM测定相似。Orasch等^[27]指出: 当GM与TAFC组合时, 灵敏度可显著提高。TAFC和/或GM的组合产生87%[具有0.5光密度指数(optical density index, ODI) GM截止值]和73%(具有1.0 ODI截止值)的阳性表达敏感性, BALF中TAFC和GM的组合有望用于确认(PPV为100%, 当两者均为阳性时)并排除IPA(NPV为92%, 当结果为阴性时)。未来还需要进行更多关于这种新的有前景的生物标志物的研究, 以确定最佳截止值, 并研究其他标本和较大患者队列的诊断性能。

8 FISH

常规ISH基于DNA或RNA分子(探针)与细胞内特定靶序列的结合, 可以使用放射性同位素(如³²P, ³⁵S, ¹²⁵I, ³H)标记核酸探针。如今, 出于安全、成本和放射性废物处理的考虑, 放射性标记的探针的使用已逐渐减少。探针也可以使用非放射性标记进行标记, 例如生物素、洋地黄毒素或荧光化学物质(荧光染料), 这种技术称为FISH。FISH方法可分为4个步骤: 1)样品的固定和透化; 2)与荧光探针杂交; 3)洗涤步骤; 4)通过落射荧光显微镜或流式细胞术检测靶序列^[2]。

与其他预先建立的方法相比, FISH具有相对容易执行、结果分析非常简单的优点。FISH得出结果的时间比微生物培养和核酸扩增短(60~90 min)^[28], 且无需对样品进行预处理, 可直接在完整样品上进行分析, 进一步缩短了得出结果的时间。FISH方法无需从样品中提取DNA, 这也是PCR不具有的优势。此外, PCR提取步骤可能使遗传物质更容易受到核酸酶的影响^[29]。材料成本明显低于所有现有的基于PCR的技术。FISH方法允许在属和物种水平上进行鉴定, 且这种技术可以确定物种的活力, 因为rRNA非常敏感, 在细胞死亡的情况下很容易被破坏^[2]。

然而, FISH方法在传染病的诊断中存在一些局限性: 首先, 生物体浓度至少为 10^5 CFU/mL才可用于检测^[28]; 其次, 微生物本身和样品中病原体周围的物质(如弹性蛋白、胶原蛋白和血细胞中的红细胞和嗜酸性粒细胞)具有自发荧光, 自发荧光通常会降低信噪比并掩盖特定的荧光信号。

在传统的FISH技术中, 使用DNA探针可能会阻碍该方法的稳健性, 因为缺乏区分单碱基错配序列的能力, 它可能呈现低特异性^[30]。DNA探针未能提供明亮信号的原因是探针和靶序列之间的低亲和力(低热稳定性)。细胞膜并不总是可以渗透DNA探针, 必须使用溶菌酶或其他蛋白水解酶进行预处理, 特别是革兰氏阳性菌。此外, 由于核糖体二级结构, rRNA可及性可能意味着杂交时间增加长达96 h^[30]。实施DNA-FISH方法的另一个障碍是通过活细胞的蛋白酶或内切核酸酶降解DNA探针。为克服DNA-FISH问题, 最近有研究者^[30-31]合成核酸模拟物分子, 用于环境和临床样品中的细胞检测。肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)是检测微生物中最常用的核酸模拟物之一。

在PNA中, DNA的带负电的糖-磷酸骨架被由N-(2个氨基乙基)甘氨酸单元组成的中性聚酰胺骨架代替^[30-32]。嘌呤和嘧啶通过亚甲基羰基键连接到聚酰胺主链上。PNA化学配置允许碱基实际上位于与天然DNA中相同的位置和相同的距离。因此, PNA可以在反平行几何中遵循Watson-Crick碱基配对规则, 与互补DNA或RNA序列杂交^[30-31]。由于PNA分子是中性的, 因此PNA和靶分子的带负电荷的糖磷酸主链之间没有静电排斥, 可允许与靶序列更强的结合。与DNA/DNA双链体和DNA/RNA双链体相比, PNA/DNA双链体的热稳定性得到改善。PNA/DNA杂交中单碱基(错配)的差异比DNA/DNA杂交中具有更多的不稳定作用。热稳定性的改善意味着PNA/DNA双链体的解链温度高于DNA/DNA双链体的解链温度, 从而使合成PNA探针(约15 bp)比大多数DNA探针(通常20~24 bp)更短, 这对PNA-FISH特异性具有很大影响^[30,32]。此外, 不需要正离子来中和阻止2个带负电荷的核酸之间结合的排斥, 因此可以在低盐条件下进行有效地杂交, 这促进了rRNA二级结构的不稳定^[30-31], 所以探针可以更容易地到达较不易接近的靶序列, 这在使用传统的FISH技术时会更困难。与其他合成分子一样, PNA对核酸酶和蛋白酶具有抗性^[30-32], 与DNA相比, 由于其疏水特性, 通过细胞膜的扩散更容易^[30]。与在酸性条件下进行净化的DNA不同, PNA在很宽的温度和pH范围内都是稳定的^[32]。此外, 与DNA溶解度相比, PNA在水中的溶解度低。

目前有团队^[2]正努力开发一种基于PNA FISH技术的试剂盒, 用于在预富集步骤之后检测临床样品中(例如血液、血清、支气管肺泡灌洗和痰液)的烟曲霉(Biocode 2)。该方法针对几种烟曲霉属菌株、非烟曲霉属和其他丝状真菌、酵母和可能与肺部疾病相关的细菌进行了测试, 获得了100%的特异性和敏感性^[2]。

9 结语

IPA发病率逐年增高, 准确检测出病原体并及时用药对降低病死率至关重要。目前传统的微生物学方法、影像学检查和非培养测试仍然是IPA诊断的基石, 但它们不敏感, 开发检测该原体的新方法是必要的。FISH方法有望成为目前用于烟曲霉检测传统方法的替代品。

参考文献

1. Cadena J, Thompson GR, Patterson TF, et al. Invasive aspergillosis: current strategies for diagnosis and management[J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2016, 30(1): 125-142.
2. 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.
3. Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species[J]. *Microb Biotechnol*, 2017, 10(2): 296-322.
4. Warris A. The biology of pulmonary aspergillus infections[J]. *J Infect*, 2014, 69(1): 36-41.
5. McCormick A, Loeffler J, Ebel F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen[J]. *Cell Microbiol*, 2010, 12(11): 1535-1543.
6. Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22(3): 447-465.
7. Page ID, Richardson M, Denning DW. Antibody testing in aspergillosis-quo vadis?[J]. *Med Mycol*, 2015, 53(5): 417-439.
8. Kosmidis C, Denning DW. Republished: the clinical spectrum of pulmonary aspergillosis[J]. *Postgrad Med J*, 2015, 91(1077): 403-410.
9. Swoboda-Kopeć E, Sikora M, Piskorska K, et al. Diagnosis of invasive pulmonary Aspergillosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 944: 27-33.
10. Hayden RT, Isotalo PA, Parrett T, et al. In situ hybridization for the differentiation of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Pseudallescheria* species in tissue section[J]. *Diagn Mol Pathol*, 2003, 12(1): 21-26.
11. Davda S, Kowa XY, Aziz Z, et al. The development of pulmonary aspergillosis and its histologic, clinical, and radiologic manifestations[J]. *Clin Radiol*, 2018, 73(11): 913-921.
12. Bellanger AP, Gbaguidi-Haore H, Tatoyan N, et al. Local retrospective analysis of galactomannan cut-off values in bronchoalveolar lavage fluids for diagnosis of invasive aspergillosis[J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2018, 63(6): 757-761.
13. Bellanger AP, Millon L, Berceanu A, et al. Combining *Aspergillus* mitochondrial and ribosomal QPCR, in addition to galactomannan assay, for early diagnosis of invasive aspergillosis in hematology patients[J]. *Med Mycol*, 2015, 53(7): 760-764.
14. Zedtwitz-Liebenstein K, Schenk P, Apfalter P, et al. Ventilator-associated pneumonia: increased bacterial counts in bronchoalveolar lavage by using urea as an endogenous marker of dilution[J]. *Crit Care Med*, 2005, 33(4): 756-759.

15. Biagi E, Col M, Migliavacca M, et al. PTX3 as a potential novel tool for the diagnosis and monitoring of pulmonary fungal infections in immuno-compromised pediatric patients[J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2008, 30(12): 881-885.
16. McCarthy MW, Walsh TJ. Special considerations for the diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillosis[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2017, 11(9): 739-748.
17. McCarthy MW, Petraitiene R, Walsh TJ. Translational development and application of (1→3)-β-d-glucan for diagnosis and therapeutic monitoring of invasive mycoses[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): 1124-1136.
18. Miceli MH, Maertens J. Role of non-culture-based tests, with an emphasis on galactomannan testing for the diagnosis of invasive aspergillosis[J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2015, 36(5): 650-661.
19. 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.
20. Buchheidt D, Reinwald M, Hoenigl M, et al. The evolving landscape of new diagnostic tests for invasive aspergillosis in hematology patients[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2017, 30(6): 539-544.
21. Buchheidt D, Reinwald M, Hofmann WK, et al. Evaluating the use of PCR for diagnosing invasive aspergillosis[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017, 17(6): 603-610.
22. Bernal-Martínez L, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M. Diagnostics and susceptibility testing in Aspergillus[J]. *Future Microbiol*, 2016, 11(2): 315-328.
23. White PL, Wingard JR, Bretagne S, et al. Aspergillus polymerase chain reaction: systematic review of evidence for clinical use in comparison with antigen testing[J]. *Clin Infect Dis*, 2015, 61(8): 1293-1303.
24. Bölük G, Kazak E, Özkalemkaş F, et al. Comparison of galactomannan, beta-D-glucan, and Aspergillus DNA in sera of high-risk adult patients with hematological malignancies for the diagnosis of invasive aspergillosis[J]. *Turk J Med Sci*, 2016, 46(2): 335-342.
25. Orsi CF, Bettua C, Pini P, et al. Detection of Pneumocystis jirovecii and Aspergillus spp. DNA in bronchoalveolar lavage fluids by commercial real-time PCR assays: comparison with conventional diagnostic tests[J]. *New Microbiol*, 2015, 38(1): 75-84.
26. Hoenigl M, Orasch T, Faserl K, et al. Triacetylfusarinine C: a urine biomarker for diagnosis of invasive aspergillosis[J]. *J Infect*, 2019, 78(2): 150-157.
27. 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.
28. Frickmann H, Zautner AE, Moter A, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2017, 43(3): 263-293.
29. Thatcher SA. DNA/RNA preparation for molecular detection[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1): 89-99.
30. Cerqueira L, Azevedo NF, Almeida C, et al. DNA Mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH)[J]. *Int J Mol Sci*, 2008, 9(10): 1944-1960.
31. Lehtola MJ, Loades CJ, Keevil CW. Advantages of peptide nucleic acid oligonucleotides for sensitive site directed 16S rRNA fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of Campylobacter jejuni, Campylobacter coli and Campylobacter lari[J]. *J Microbiol Methods*, 2005, 62(2): 211-219.
32. Shakeel S, Karim S, Ali A. Peptide nucleic acid (PNA)—a review[J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2006, 81(6): 892-899.

本文引用: 马欣雨, 于世寰. 侵袭性肺曲霉病检测方法进展[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(6): 1584-1589. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.06.042

Cite this article as: MA Xinyu, YU Shihuan. Progress in detection methods of invasive pulmonary aspergillosis[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(6): 1584-1589. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.06.042