

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20180033

侵袭性肺曲霉病诊断方法的研究进展

任增花, 徐凌*

上海交通大学附属第六人民医院呼吸内科, 上海 200233

[摘要] 侵袭性曲霉病(invasive aspergillosis, IA)是免疫功能低下患者最常见的侵袭性真菌感染,致死率高。由于曲霉菌孢子飘浮于空气中而易被吸入,IA中以侵袭性肺曲霉病(invasive pulmonary aspergillosis, IPA)最常见。然而,由于临床表现不典型,诊断金标准即病理学依据获得困难,IPA的诊断仍具挑战性,尤其是在疾病早期阶段。因此,寻找简便、快速、准确性高的诊断方法具有重要意义。本文就目前IPA的诊断进展作一综述。

[关键词] 侵袭性肺曲霉病;诊断方法;研究进展

[中图分类号] R 519 **[文献标志码]** A

Research progress in diagnostic methods of invasive pulmonary aspergillosis

REN Zeng-hua, XU Ling*

Department of Respiratory Medicine, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

[Abstract] Invasive aspergillosis (IA) is the most common invasive fungal infection with high mortality in immunosuppressed patients. Through aspergillus spores floating in the air and easily be inhaled, invasive pulmonary aspergillosis (IPA) is most common. However, due to clinical manifestations of IPA are not typical, and the diagnostic gold standard is difficult to obtain based on pathology, IPA diagnosis is still challenging, especially at early stages. The development of simple, rapid and accurate diagnostic method is of great significance. This paper reviews the diagnostic methods of IPA in recent years.

[Key Words] invasive pulmonary aspergillosis; diagnosis; research progress

近年来,随着广谱抗生素、糖皮质激素、细胞毒药物及免疫抑制剂的广泛使用,HIV感染者的增多以及导管介入、放疗等的大量开展,肺部真菌感染呈上升趋势,其中最为严重的是侵袭性真菌感染(invasive fungal infection,IFI)。IFI中最常见的病原菌为曲霉菌^[1]。曲霉菌多存在于潮湿、阴暗且通风不良的环境中,其孢子飘浮于空气中易被吸入,因此以感染肺部最常见。侵袭性肺曲霉病(invasive pulmonary aspergillosis, IPA)是最常见的侵袭性曲霉病(invasive aspergillosis, IA),发病率逐年升高,且致死率高^[2]。IPA的诊断金标准为病理学检查,但其实施较困难,因此,寻找新的能够早期迅速诊断IPA的方法具有重要临床意义,目前多项研究致力于为IPA的早期诊断提供依据。

1 影像学检查

IPA临床症状和体征缺乏特异性,影像学检查

为其重要辅助诊断方法。胸部CT检查可确定病变部位、数量、大小,辅助判断病变性质。根据CT表现,可将IPA分为血管侵袭性和气管侵袭性。气管侵袭性IPA侵犯气管基底膜和细支气管,CT上可表现为沿支气管血管束分布的斑片状模糊影、磨玻璃影及多发小叶中心结节、树芽征;血管侵袭性IPA CT上多表现为多发胸膜下实变影或结节、团块影,伴有晕轮征、空气新月征、空洞等,空气新月征和空洞常重叠出现^[3]。有文献^[3]报道,IPA气管侵袭常发生于非血液疾病继发的IPA,而其血管侵袭多发生于血液系统肿瘤患者。晕轮征在起病后1~2周出现,表现为结节或实变周围磨玻璃影。空气新月征在起病后2~3周出现,表现为空洞或空腔内的球形病灶与洞壁之间的新月状透亮影。典型的晕轮征、空气新月征对诊断IPA具有一定的特异性,但并不多见^[4-5]。也有研究^[6-7]认为由于曲霉菌侵袭血管,CT肺血管造影(computed tomography

[收稿日期] 2018-01-09

[接受日期] 2018-04-11

[作者简介] 任增花,硕士生,住院医师. E-mail: 1838940467@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-24058361; E-mail: quanlingxu@163.com

pulmonary angiography, CTPA) 可发现血管闭塞症, 此征象在诊断 IPA 时比传统 CT 的晕轮征和空气新月征具有更高的比值比(OR), 且其阴性结果具有更低的阴性似然比(0.11~0.21 vs 0.47~0.83), 因此排除 IPA 的价值更大。

2 微生物学检查

2.1 标本镜检 典型的曲霉菌形态表现为无色、分隔、45°分支、直径 3~12 μm 的菌丝; 当曲霉菌存在于空洞病灶或窦中时, 可见具有分生孢子的囊泡^[8]。痰是最常用的镜检标本, 曲霉菌的致炎导致大量脓细胞聚集, 当痰涂片直接镜检发现大量脓细胞时, 可初步排除定植。革兰染色法可见特征性结节状结构, 此为曲霉菌丝被中性粒细胞包裹而形成, 可见中性粒细胞核固缩和核碎裂, 为曲霉菌产生的胶霉毒素(gliotoxin, GT) 导致中性粒细胞凋亡所致^[9]。苏木精-伊红(H-E)染色中, 由于真菌孢子和菌丝呈浅红色, 不易与背景颜色区分, 检出率不佳。KOH 饱和液染色法可破坏痰液中的细胞成分而保留菌丝完整性, 提高曲霉菌检出率。碘酸雪夫染色(PAS)染色使菌丝呈红色; 六胺银染色(GMS)染色使菌丝呈黑色, 从而区别于背景色, 提高检出率^[10]。

对于活检标本, 可使用改良的 Calcofluor 荧光染色法在光镜和荧光显微镜下进行观察: 光镜下见固有形态, 荧光显微镜下真菌则呈亮蓝色^[11]。组织病理学虽为诊断金标准, 但临床上怀疑 IPA 的患者常因病情较重而无法行肺活检, 且组织病理学检测存在约 20% 的假阴性结果^[8], 因此限制了其应用价值。除痰液及活检标本外, 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)、气管内吸引物、胸腔积液也为常用标本。

2.2 培养法 用于培养的标本类型多样, 无菌部位标本培养结果阳性有确诊价值。培养条件标准化有利于曲霉菌呈现典型形态, 大体上为绒毛状、顶端膨大、放射状排列的分生孢子头。菌落颜色及分生孢子头形态为群的划分依据。基于不同曲霉菌的生长特性, 可通过改变培养条件达到鉴别诊断的目的, 例如: 提高培养基含糖量可加快局限曲霉菌的生长速度; 对于耐高温曲霉菌, 可通过提高生长温度进行鉴别(曲霉菌于 25~37°C 均可生长)。然而, 曲霉菌培养灵敏度在不高, 培养法耗时长, 难以用于早期诊断, 且不能确定是正常菌群还是感染

所致^[12-14]。

3 抗原检测法

3.1 半乳甘露聚糖(galactomannan, GM) 试验 GM 是曲霉菌在组织中生长时释放的细胞壁的组成部分, 可以在血清、痰液和其他无菌体液中被检测到。检测方法有乳胶凝集试验和酶联免疫吸附试验(ELISA), 使用 ELISA 法检测 GM 是目前公认的最为敏感的检测方法。GM 试验标本的选取主要为血清和 BALF。GM 可被中性粒细胞清除, 因此非中性粒细胞减少患者血清 GM 的检测对 IPA 的诊断价值有限。BALF 中 GM 局部浓度高, 且可避免中性粒细胞的影响, 因此其灵敏度及特异度均高于血清^[15-17]。以血清为标本时, GM 界值取 0.5 较为恰当^[18]; 以 BALF 为标本时, GM 界值应大于 0.5, 否则将增加假阳性结果^[19]; 多数文献^[20-22]支持 1.0 为以 BALF 为标本时 GM 理想的阳性阈值。一项 meta 分析^[21-23]显示, GM 试验 BALF 的界值为 1.0 时, 诊断的灵敏度、特异度分别为 86%、95%; 而血清 GM 试验以 0.5 为界值时, 其灵敏度、特异度分别为 65%、95%。但对于慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 患者, 研究^[21]显示, 当 BALF 界值取 0.5 时, 诊断的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 88.9%、88.4%、72.7%、95.8%, 与界值为 1.0 (66.7%、96.2%、85.7%、89.3%) 相比, 诊断效率更高。对于 COPD 患者, 也可选择痰液为标本, 可减少侵入性操作带来的不适, 相比, 其诊断灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值与 BALF 标本差异无统计学意义, 且略高于血清标本^[24]。以血清为标本时, 采用连续重复测量的方法可明显增加特异度, 但可降低灵敏度, 同时阴性预测值并不明显降低^[25]。

近期一项研究^[26]将 BALF-GM 试验与 BALF-3-乙酰镰孢氨酸(triacetylfusarinine C, TAFC) 检测相结合来提高血液系统恶性肿瘤患者 IPA 的诊断效率。TAFC 是由烟曲霉菌产生的铁载体之一, 介导感染过程中宿主铁的获取。该研究显示, BALF-GM 试验与 BALF-TAFC 联合检测可将诊断灵敏度从单用 GM 试验的 53% (以 1.0 为界值)、73% (以 0.5 为界值) 提高到 73%、87%, 预示两者联合将有良好的应用前景。Reischies 等^[27]探讨了尿 GM/尿肌酐用于诊断血液系统恶性肿瘤患者 IA 的

价值,发现当取界值为 0.26 时,其诊断 IA 的敏感性为 79%、阴性预测值 >98%,而阳性预测值仅为 13%,因此认为尿 GM/尿肌酐用于排除 IA 的价值较大。该研究以尿液为标本,标本留取方便、非侵入,可获取样本量大,为 GM 检测 IPA 的进一步研究提供了新思路。但由于该研究样本量小($n=79$),且未区分 IA 种类,故用于诊断 IPA 的价值尚需进一步研究。

虽然 GM 试验是目前检测 IPA 较为敏感的方法,但其假阳性和假阴性问题仍不可忽略,存在以下情况时应考虑假阳性的存在^[16, 18-19, 28-30]:(1)使用半合成青霉素尤其是哌拉西林或他唑巴坦;(2)患者患有多发性骨髓瘤;(3)异体骨髓移植患者、移植抗宿主病患者、自身抗体阳性患者、菌血症患者及肠道双歧杆菌定植的婴儿;(4)使用含有 GM 的血制品;(5)存在青霉属、链格孢霉属、拟青霉菌属、镰刀菌属、组织胞浆菌和隐球菌属等其他真菌感染。假阴性原因^[15, 31]:(1)在 IPA 早期阶段,血管只是轻微受侵犯,释放入血液的真菌数量不足;(2)应用抗真菌药物。

3.2 BALF 检测(1,3)- β -D 葡聚糖(G 试验) (1,3)- β -D-葡聚糖[(1,3)-beta-D-glucan, BDG]存在于除隐球菌和接合菌之外的各种真菌属细胞壁中。真菌通过吞噬细胞的吞噬和消化功能,将其细胞壁中的抗原物质 BDG 释放入人体的血液或其他体液中。因体液中 BDG 代谢不稳定,故体液 BDG 检测的诊断价值是否优于血清须进一步研究。根据采用的界值不同,血清 G 试验总体灵敏度波动在 80%~90%,特异度波动在 36%~92%^[17]。一项 meta 分析^[32]表明,血清标本采用中华鲎卵蛋白试验以 20 pg/mL(AUC-SROC=0.9943)为界值,采用美洲鲎卵蛋白试验以 60 pg/mL 为界值(AUC-SROC=0.8973)时,均具有较好的诊断价值,前者灵敏度、特异度分别为 93%、100%,后者灵敏度、特异度分别为 81%、67%。

有文献^[17, 33]比较了 G 试验和 GM 试验在 IPA 早期诊断中的价值,结果表明,G 试验在高危患者 IPA 的早期诊断中价值可能更大。通过 G 试验诊断 IPA 时,须注意 G 试验阳性可见于除隐球菌和接合菌之外的各种侵袭性真菌病^[30]。此外,须注意假阳性及假阴性的问题。假阳性见于^[17, 34-36]:(1)使用以真菌为原料制成的抗生素,如哌拉西林或他唑巴坦、阿莫西林或克拉维酸;(2)使用抗肿瘤的多糖

类药物,如香菇多糖、云芝多糖 K 等;(3)使用白蛋白、球蛋白等;(4)使用纤维素膜进行血液透析者;(5)菌血症患者;(6)待检血样为溶血标本;(7)血液接触被葡聚糖污染的血液收集管或纱布。假阴性见于^[15, 31]:(1)机体免疫功能极度低下,无法排除真菌感染,BDG 就无法释放至血液中;(2)使用抗真菌药物治疗,如使用卡泊芬净,其可非竞争性抑制 BDG 合成。

3.3 双甲硫基胶霉毒素[bis(methylthio)gliotoxin, bmGT]检测 GT 是烟曲菌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,存在于患者血清和 BALF 中^[37-38],但有活性的 GT 会很快被组织和细胞代谢而难以被发现。bmGT 是胶霉毒素的衍生物,相对稳定,可在血清中被检测到。Domingo 等^[39]发现,bmGT 可在获得真菌感染证据之前被检测到,且不存在于健康人血清中。bmGT 检测与 GM 试验具有相似的特异度和阴性预测值,但 bmGT 检测有更高的灵敏度和阳性预测值。bmGT 检测联合 GM 试验可提高曲霉病的阳性预测值(100%)和阴性预测值(97.5%),预示其可作为曲霉病的诊断指标^[39-40]。

3.4 免疫层析侧流仪(immunochromatographic lateral flow device, LFD)法 该法目前多采用单克隆抗体(MAb-JF5)检测曲霉菌抗原。靶抗原不同于 GM,是一种细胞外糖蛋白,仅在曲霉菌活跃生长时分泌,可作为曲霉菌感染的生物学标志。待检标本可选用血清、BALF。一项 meta 分析^[41]显示,以血清为标本,LFD 法诊断 IA 的灵敏度为 68%、特异度为 87%,诊断优势比(diagnostic odds ratio, DOR)为 11.90。LFD 法中使用血清为标本时须对血清进行预处理,且对预处理的要求较高。相比血清,LFD 法以 BALF 为标本诊断 IA 时不需预处理。一项 meta 分析^[41]显示,LFD 法以 BALF 为标本诊断 IA 的灵敏度为 86%、特异度为 93%、DOR 为 65.94。

近年来,多项研究^[42-44]表明,LFD 法以 BALF 为标准诊断 IPA 的效率较高,其阴性预测值为 95%~100%。Castillo 等^[45]比较了 LFD 法与 GM 试验在高危 IPA 患者中诊断的灵敏度及特异度,结果表明,两者的诊断性能相当,灵敏度均欠佳但特异度均较高,且联合使用并不改善诊断效能。对无法获取 BALF 的 IPA 患者,可联合使用曲霉菌特异性单克隆抗体 JF5 与 PET/MRI。JF5 能引导放射

性核素浓集于感染部位,从而追踪曲菌生长活跃的肺组织^[37]。该方法重复性好,约 15 min 出结果,但患者应用抗真菌药物时可出现假阴性,且肉眼观察易出现偏差^[31]。此外,IPA 患者尿液中含有真菌 GM 样抗原,基于此抗原设计的新型单克隆抗体 MA476 用于 LFD(MA476-LFD)检测的方法已被开发,该技术以尿液为标本,类似“尿妊娠实验”,可快速实时检测 IA 感染,方便快捷,但其可行性须进一步研究验证^[46]。

4 抗体检测法

抗体的产生需要有一定的时间且要求机体免疫应答能力正常,而大多数血液系统恶性肿瘤、造血干细胞移植、长期应用糖皮质激素等患者免疫应答能力不足,且 IPA 患者短期内通常不发生血清转化和抗体反应。因此,抗体检测的临床应用价值不大。

5 分子生物学方法

5.1 核酸分子杂交和扩增技术 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 也可用于诊断 IPA。PCR 的诊断效率不低于 GM 试验和 G 试验^[47]。BALF-PCR 检测方法比 GM 试验和 G 试验特异度更高,更适合于诊断试验^[48]。目前已有多种 PCR 技术用于检测各种临床标本中的霉菌且有较高的诊断率,如巢式 PCR、实时定量 PCR、多重 PCR、荧光定量 PCR、PCR-限制性片段长度多态性分析(RFLP)技术、随机引物扩增 DNA 多态性(RAPD)技术等。

巢式 PCR 虽灵敏度高,但因其需要 2 次 PCR 反应,增加了污染机会^[49]。PCR 检测的标本可选用血、BALF、脑脊液等。因曲霉菌孢子可存在于口腔和上呼吸道,BALF 极易被污染,PCR 难以分辨定植和侵袭感染。因此,区别于 GM 试验,血液是 PCR 的首选标本。对同一血液标本的线粒体和核糖体同时行实时定量曲霉菌 PCR 检测,可提高其早期诊断效率^[50-51]。有文献^[49]报道,全血或血清实时 PCR 检测技术在 ICU 患者中诊断 IA 感染的灵敏度及特异度分别为 66%、98%。因血循环中真菌 DNA 是不连续释放的,一般建议每周至少检测 2 次,单次结果阳性需考虑假阳性,可能由污染、呼吸道 IA 定植或临床样本中 IA 一过性存在导致;假阴性则与抗真菌治疗过程中血中真菌负荷快速减小

有关^[52]。然而,目前 PCR 法缺乏标准化的操作技术和质量评估方案,致各研究间敏感性和特异性差异显著,且检测费用较高、检测时间较长,使其在 IPA 诊断中的使用受到阻碍。

在 PCR 技术基础上发展起来的依赖核酸序列的扩增技术 (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) 不要求温度循环,可恒温扩增 RNA,在 30 min 内即可产生 1 012 个扩增子,扩增的单链 RNA 很容易被探针检测到,故可从临床样本中快速灵敏地检测曲霉菌。一项以大鼠为研究对象的动物试验^[53]表明,相比较实时 PCR 和培养技术,实时 NASBA 检测曲霉菌的灵敏度更高。一项前瞻性多中心研究^[54]证实,血标本 NASBA 监测可用于评估抗真菌治疗反应,曲霉菌 RNA 负荷在应用抗真菌药物治疗 4~6 周的变化可预测患者治疗 12 周的预后,抗真菌药物治疗 4~6 周真菌负荷无下降提示 12 周预后不佳。

5.2 基因探针 真菌核糖体 RNA 的碱基序列由可变区和保守区组成;利用保守区可设计通用探针;利用可变区可设计针对不同菌种的特异性探针。吗啉寡聚物 (morpholino oligomers, MORFs) 通过 Watson-Crick 碱基配对与其互补的 DNA 或 RNA 结合,并对核酸酶具有抵抗性,与血清蛋白质结合率低,可进入细胞并在循环中被迅速清除。因此,有研究^[55]用^{99m}Tc 标记的 MORFs 探针靶向真菌核糖体 RNA,结合 SPECT 成像用于检测曲霉菌感染,这有望成为诊断曲霉菌感染的新方法。

5.3 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 技术 该技术将真菌光谱与已知数据库中的物种特异性肽光谱指纹图谱对比,进行诊断 IPA。不同于细菌,丝状真菌须破坏细胞壁后提取其蛋白质^[56],这促使该技术不断更新以提高诊断效率^[57]。Alanio 等^[58]用 MALDI-TOF-MS 技术鉴定曲霉菌属,鉴定能力可达到种的水平,因此,该技术可提高 IPA 诊断效率,且菌种鉴定更加准确。但为提高 MALDI-TOF-MS 的诊断有效性,数据库中菌株的特异性肽光谱指纹图谱应涵盖种内变异种。Tam 等^[59]通过对 3 个独立的 DNA 区域 [内部转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS)、 β -微管蛋白和钙调蛋白基因] 进行扩增和测序,进一步区分了与黄曲霉菌相似的特异曲霉菌 (*A. nomius*) 和溜曲霉菌 (*A. tamarii*),提示利用基因检测可辅助完善该技术数据库,提高其检测准

确性。

5.4 血清微小 RNA 研究^[60]显示,IPA 和肺癌患者血清中 miR-21 均高表达,但 miR-21 血清水平为 0.198~0.723 时才对鉴别诊断 IPA 有较好的价值;miR-21 联合 G 试验和 GM 试验诊断 IPA 的价值优于各单项或双项联合。因此,可以认为 miR-21 是潜在的 IPA 诊断血清标志物。

5.5 细胞因子 Gonçalves 等^[61]探讨了 BALF 中细胞因子水平与 IPA 的关联性,结果显示,IL-8 肺泡水平 ≥ 904 pg/mL 预测 IPA 的敏感性和特异性分别为 90%、73%,阴性预测值 88%,说明 IL-8 是 IPA 良好的生物标志物。此项研究突出了 IPA 患者中肺泡细胞因子呈一定特异性。同时,Heldt 等^[62]研究认为,血清和 BALF 中 IL-6 和 IL-8 水平与 IPA 有关,提示细胞因子用于诊断 IPA 的潜在价值。

6 呼气检测

有研究^[63]指出,IPA 患者会呼出特定的挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOCs),电子鼻可以通过分析呼出的 VOCs 来区分各种肺部疾病,从而诊断 IPA(准确性为 90.9%)。此法价廉且无创,在几分钟内即可得出结果,但其有效性目前缺乏临床大样本研究验证。

7 小结

IPA 早期诊断的方法较多,包括传统的真菌涂片、真菌培养、GM 试验、G 试验、PCR 法等。真菌涂片快速经济,仍为其重要的检查手段。培养可进一步提高诊断敏感性,但需时较长。GM 试验标本主要为血清及 BALF,以 BALF 准确性较高。近期有学者通过联合 BALF-GM 试验与 BALF-TAFC 检测来提高血液系统恶性肿瘤患者 IPA 的诊断效能,或用尿 GM/尿肌酐检测血液系统恶性肿瘤患者 IA,为 GM 检测 IPA 提供了新思路。G 试验标本主要为血清。对于不便于应用 GM、G 试验又须快速得到结果的患者,可使用 PCR 法。在 PCR 技术基础上发展起来的 NASBA 可恒温快速扩增 RNA,较传统 PCR 诊断灵敏度更高。其他如 bmGT、LFD、MALDI-TOF-MS 技术、血清微小 RNA 检测、肺泡细胞因子 IL-8 检测等同样有潜在的应用前景。CT 检查特异性不佳,可作为诊断 IPA 的参考。无论何种诊断方法,均须考虑假阳性、假阴性问题,综合个体情况考虑诊断是否成立。总之,对于怀疑 IPA 的

患者,需充分评估病情,合理利用各种检测方法,争取早期准确诊断、早期给予有效治疗,避免漏诊及误诊,提高患者生存率。

参考文献

- [1] DIGNANI M C. Epidemiology of invasive fungal diseases on the basis of autopsy reports [J]. F1000Prime Rep, 2014, 6:81.
- [2] SUN K S, TSAI C F, CHEN S C, et al. Galactomannan testing and the incidence of invasive pulmonary aspergillosis: a 10-year nationwide population-based study in Taiwan [J]. PloS one, 2016, 11(2):e0149964.
- [3] XU X Y, SUN H M, ZHAO B L, et al. Diagnosis of airway-invasive pulmonary aspergillosis by tree-in-bud sign in an immunocompetent patient: case report and literature review [J]. J Mycol Med, 2013, 23(1):64-69.
- [4] 徐思成,董旭南,拜合提尼沙·吐尔地,等. 侵袭性肺曲霉病的初次 CT 特点 [J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25(4): 229-232.
- [5] 陈玉玲,左丽娜,张文辉,等. 侵袭性肺曲霉感染 CT 特征与预后 [J]. 临床放射学杂志, 2013, 32(2):193-196.
- [6] HENZLER C, HENZLER T, BUCHHEIDT D, et al. Diagnostic performance of contrast enhanced pulmonary computed tomography angiography for the detection of angioinvasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised patients [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):4483.
- [7] STANZANI M, SASSI C, LEWIS R E, et al. High resolution computed tomography angiography improves the radiographic diagnosis of invasive mold disease in patients with hematological malignancies [J]. Clin Infect Dis, 2015, 60(11):1603-1610.
- [8] GUARNER J, BRANDT M E. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century [J]. Clin Microbiol Rev, 2011, 24(2):247-280.
- [9] ROBINET P, BAYCHELIER F, FONTAINE T, et al. A polysaccharide virulence factor of a human fungal pathogen induces neutrophil apoptosis via NK cells [J]. J Immunol, 2014, 192(11):5332-5342.
- [10] 施毅,孙文远. 肺部真菌感染病原学检测的方法及其临床意义 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34(9):644-647.
- [11] 杨通,谭亚夏. 活检组织中真菌 Calcofluor White 荧光染色法的改良 [J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(05):767-771.
- [12] 王卫彪,杨冬. 支气管哮喘合并侵袭性肺曲霉病 1 例报告 [J]. 中国临床医学, 2016, 23(2):256-258.
- [13] MAERTENS J A, RAAD I I, MARR K A, et al. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by aspergillus and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial [J]. Lancet, 2016, 387(10020):760-769.
- [14] MARR K A, SCHLAMM H T, HERBRECHT R, et al.

- Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis: a randomized trial[J]. *Ann Intern Med*, 2015,162(2):81-89.
- [15] KOULENTI D, GARNACHO-MONTERO J, BLOT S. Approach to invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2014,27(2):174-183.
- [16] PEMAN J, ZARAGOZA R. Combined use of nonculture-based lab techniques in the diagnosis and management of critically ill patients with invasive fungal infections [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2012,10(11):1321-1330.
- [17] LAHMER T, NEUENHAHN M, HELD J, et al. Comparison of 1, 3-beta-d-glucan with galactomannan in serum and bronchoalveolar fluid for the detection of *Aspergillus* species in immunosuppressed mechanically ventilated critically ill patients[J]. *J Crit Care*, 2016,36:259-264.
- [18] MIKULSKA M, FURFARO E, VISCOLI C. Non-cultural methods for the diagnosis of invasive fungal disease [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2015,13(1):103-117.
- [19] MARTÍN-RABADÁN P, GIJÓN P, ALONSO FERNÁNDEZ R, et al. False-positive aspergillus antigenemia due to blood product conditioning fluids[J]. *Clin Infect Dis*, 2012,55(4):e22-e27.
- [20] CHAI L Y, KULLBERG B J, JOHNSON E M, et al. Early serum galactomannan trend as a predictor of outcome of invasive aspergillosis [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50 (7): 2330-2336.
- [21] FORTÚN J, MARTÍN-DÁVILA P, GOMEZ GARCIA DE LA PEDROSA E, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive aspergillosis in non-hematological patients[J]. *J Infect*, 2016,72(6):738-744.
- [22] SPRINGER J, LACKNER M, NACHBAUR D, et al. Prospective multicentre PCR-based *Aspergillus* DNA screening in high-risk patients with and without primary antifungal mould prophylaxis[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22(1):80-86.
- [23] ZOU M, TANG L, ZHAO S, et al. Systematic review and meta-analysis of detecting galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive aspergillosis [J]. *PLoS one*, 2012,7(8):e43347.
- [24] 王建友,周阿旺,陈丹. 半乳甘露聚糖在 COPD 患者侵袭性肺曲霉病的诊断价值[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014,24(4): 540-542.
- [25] OKUTURLAR Y, OZKALEMKAS F, ENER B, et al. Serum galactomannan levels in the diagnosis of invasive aspergillosis [J]. *Korean J Intern Med*, 2015, 30 (6): 899-905.
- [26] 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.
- [27] REISCHIES F M, RAGGAM R B, PRATTES J, et al. Urine Galactomannan-to-creatinine ratio for detection of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies[J]. *J Clin Microbiol*, 2016,54(3):771-774.
- [28] PARK S Y, LEE S O, CHOI S H, et al. *Aspergillus* galactomannan antigen assay in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis[J]. *J Infect*, 2010,61(6):492-498.
- [29] KO J H, PECK K R, LEE J Y, et al. Multiple myeloma as a major cause of false-positive galactomannan tests in adult patients with cancer[J]. *J Infect*, 2016,72(2):233-239.
- [30] 中华医学会呼吸病学分会感染学组, 中华结核和呼吸杂志编辑委员会. 肺真菌病诊断和治疗专家共识[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2007,30(11):821-834.
- [31] EIGL S, PRATTES J, REINWALD M, et al. Influence of mould-active antifungal treatment on the performance of the *Aspergillus*-specific bronchoalveolar lavage fluid lateral-flow device test [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2015, 46 (4): 401-405.
- [32] HE S, HANG J P, ZHANG L, et al. A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3-beta-D-glucan for invasive fungal infection: Focus on cutoff levels [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2015,48(4):351-361.
- [33] LAHMER T, RASCH S, SCHNAPPAUF C, et al. Comparison of serum galactomannan and 1,3-beta-D-glucan determination for early detection of invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with hematological malignancies and septic shock[J]. *Mycopathologia*, 2016,181(7-8):505-511.
- [34] PICKERING J W, SANT H W, BOWLE S C A, et al. Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43 (12):5957-5962.
- [35] SULAHIAN A, PORCHER R, BERGERON A, et al. Use and limits of (1-3)-beta-d-glucan assay (Fungitell), compared to galactomannan determination (platelia aspergillus), for diagnosis of invasive aspergillosis[J]. *J Clin Microbiol*, 2014,52(7):2328-2333.
- [36] 胡毓安,黄梅,王卫萍. 菌血症患者血浆(1,3)-β-D-葡聚糖结果分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2011,26(2):49-52.
- [37] THORNTON CR. Breaking the mould - novel diagnostic and therapeutic strategies for invasive pulmonary aspergillosis in the immune deficient patient[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2014,10(6):771-780.
- [38] 周万青,沈瀚,张之焯,等. 烟曲霉胶霉毒素的研究进展[J]. *中国真菌学杂志*, 2011,06(2):118-121.
- [39] DOMINGO M P, COLMENAREJO C, MARTINEZ-LOSTAO L, et al. Bis (methyl) gliotoxin proves to be a more stable and reliable marker for invasive aspergillosis than gliotoxin and suitable for use in diagnosis[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012,73(1):57-64.
- [40] VIDAL-GARCIA 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.
- [41] PAN Z, FU M, ZHANG J, et al. Diagnostic accuracy of a novel lateral-flow device in invasive aspergillosis: a meta-analysis[J]. J Med Microbiol, 2015,64(7):702-707.
- [42] WILLINGER B, LACKNER M, LASS-FLÖRL C, et al. Bronchoalveolar lavage lateral-flow device test for invasive pulmonary aspergillosis in solid organ transplant patients: a semipropective multicenter study [J]. Transplantation, 2014,98(8):898-902.
- [43] PRATTES J, FLICK H, PRULLER F, et al. Novel tests for diagnosis of invasive aspergillosis in patients with underlying respiratory diseases[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014,190(8):922-929.
- [44] 李玉苹,张冬青. 侵袭性曲霉菌病生物标志物应用进展[J]. 国际呼吸杂志, 2015, 35(18):1434-1434.
- [45] CASTILLO C G, KAUFFMAN C A, ZHAI J, et al. Testing the performance of a prototype lateral flow device using bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in high-risk patients[J]. Mycoses, 2018,61(1):4-10.
- [46] HELDT S, HOENIGL M. Lateral flow assays for the diagnosis of invasive aspergillosis: current status[J]. Curr Fungal Infect Rep, 2017,11(2):45-51.
- [47] 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.
- [48] WHITE P L, WINGARD J R, 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.
- [49] STEINMANN J, BUER J, RATH P M. Detection of Aspergillus fumigatus in blood samples from critically ill patients in Intensive Care Units by use of the SeptiFast Assay [J]. J Clin Microbiol, 2016,54(7):1918-1921.
- [50] BELLANGER A P, 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.
- [51] MILLON L, GRENOUILLET F, LEGRAND F, et al. Ribosomal and mitochondrial DNA target for real-time PCR diagnosis of invasive aspergillosis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(3):1058-1063.
- [52] CRUCIANI M, MENGOLI C, LOEFFLER J, et al. Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised people [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2015,(10):CD009551.
- [53] ZHAO Y, PARK S, WARN P, et al. Detection of Aspergillus fumigatus in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis by real-time nucleic acid sequence-based amplification [J]. J Clin Microbiol, 2010,48(4):1378-1383.
- [54] ZHAO Y, PADERU P, RAILKAR R, et al. Blood aspergillus RNA is a promising alternative biomarker for invasive aspergillosis[J]. Med Mycol, 2016,54(8):801-807.
- [55] WANG Y, CHEN L, LIU X, et al. Detection of aspergillus fumigatus pulmonary fungal infections in mice with (99m)Tc-labeled MORF oligomers targeting ribosomal RNA[J]. Nucl Med Biol, 2013,40(1):89-96.
- [56] SCHULTHESS B, LEDERMANN R, MOUTTET F, et al. Use of the Bruker MALDI Biotyper for identification of molds in the clinical mycology laboratory [J]. J Clin Microbiol, 2014,52(8):2797-2803.
- [57] LAU A F, DRAKE S K, CALHOUN L B, et al. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(3): 828-834.
- [58] ALANIO A, BERETTI J L, DAUPHIN B, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant Aspergillus species[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(5):750-755.
- [59] TAM E W, CHEN J H, LAU E C, et al. Misidentification of aspergillus nomius and aspergillus tamarri as aspergillus flavus: characterization by internal transcribed spacer, beta-tubulin, and calmodulin gene sequencing, metabolic fingerprinting, and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. J Clin Microbiol, 2014,52(4):1153-1160.
- [60] 文智能, 凌宙贵, 黄颖, 等. 血浆微小RNA-21表达水平对侵袭性肺曲霉病的诊断价值[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2017,40(4):272-277.
- [61] GONCALVES S M, LAGROU K, RODRIGUES C S, et al. Evaluation of bronchoalveolar lavage fluid cytokines as biomarkers for invasive pulmonary aspergillosis in at-risk patients[J]. Front Microbiol, 2017,8:2362.
- [62] HELDT S, EIGL S, PRATTES J, et al. Levels of interleukin (IL)-6 and IL-8 are elevated in serum and bronchoalveolar lavage fluid of haematological patients with invasive pulmonary aspergillosis[J]. Mycoses, 2017,60(12): 818-825.
- [63] 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.

[本文编辑] 姬静芳