

• 综 述 •

肺曲霉病诊断方法的研究进展*

万清清^{1,2}综述,彭 丽^{1△}审校(重庆医科大学附属第一医院呼吸与危重症医学科,重庆 400016;2. 重庆市綦江区
人民医院全科医学科,重庆 401420)

[摘要] 全球每年侵袭性真菌感染人数高达约 655 万人,并导致约 380 万人死亡,其中曲霉菌属肺部感染最常见。由于肺曲霉病在临床和影像学表现特异性不明显,传统实验室检测存在不同程度的检测周期长、灵敏度相对较低等局限,下一代测序、曲霉菌聚合酶链反应等分子生物学检测技术较好地弥补了传统诊断技术的不足,分子生物学技术势必会迎来更广泛的应用前景。

[关键词] 侵袭性曲霉病; 半乳甘露聚糖抗原; 分子诊断技术; 聚合酶链反应; 下一代测序; 支气管肺泡灌洗液; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2024.22.028

中图法分类号:R56

文章编号:1009-5519(2024)22-3923-06

文献标识码:A

Research progress on diagnostic methods for pulmonary aspergillosis*

WAN Qingqing^{1,2}, PENG Li^{1△}(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of General
Medicine, the People's Hospital of Qijiang District in Chongqing, Chongqing 401420, China)

[Abstract] The number of invasive fungal infections is as high as about 6.55 million people each year in the world, and it leads to about 3.8 million deaths, among which aspergillus pulmonary infection is the most common. Because the specificity of clinical and imaging manifestations of pulmonary aspergillosis is not obvious, traditional laboratory tests have different degrees of limitations such as long detection period and relatively low sensitivity. Molecular biology detection techniques such as next generation sequencing and Aspergillus polymerase chain reaction have made up for the shortcomings of traditional diagnostic techniques. Molecular biology technology is bound to usher in a broader application prospect.

[Key words] Invasive aspergillus; Galactomannan antigen; Molecular diagnostic techniques; Polymerase chain reaction; Next generation sequencing; Bronchoalveolar lavage fluid; Review

据报道,每年全球侵袭性真菌感染人数高达约 655 万,并导致约 380 万人死亡,其中约 210 万侵袭性曲霉病(IA)患者、180 万慢性肺曲霉病(CPA)患者^[1]。曲霉是一种无处不在的腐生霉菌,常见于土壤、水和建筑材料中,会引起一系列疾病,最常见的是在免疫功能低下或有肺部基础疾病者发生的肺曲霉病^[2]。肺曲霉病的表现形式取决于宿主的免疫状态,哮喘或囊性纤维化患者常引起支气管过敏反应,即变应性支气管肺曲霉病(ABPA)^[2]。如果发生在慢性阻塞性肺

疾病、肺结核后遗症、非结核分枝杆菌感染、肺癌、肺纤维化等肺部基础疾病而免疫功能相对正常或轻度抑制者,则常以 CPA 的形式存在。当机体免疫功能进一步降低时,CPA 可向邻近肺组织侵袭和坏死,发展为亚急性 IPA。基于上述理由,有学者提出轻、中度免疫功能低下患者发生 CPA 时应按 IA 进行治疗。IPA 主要发生在血液系统恶性肿瘤、化疗引起的持续性中性粒细胞减少或缺乏、自身免疫疾病或脏器移植后接受大剂量长时间激素和免疫抑制剂治疗的患

* 基金项目:重庆市科卫联合医学科研项目(2020FYYX191)。

△ 通信作者, E-mail: plil228@163.com。

者^[3-4]。近年来,有报道 IPA 也是重症流感和重症新冠感染较为常见的并发症^[4]。

由于肺曲霉病的表现形式多样,并且多数存在基础疾病,无法耐受经支气管或经皮的支气管或肺活检术,下呼吸道标本的质量不高,传统的肺曲霉病诊断方式面临敏感性和特异性较低的严重挑战^[5]。肺曲霉病快速诊断已引起全球的重点关注,近年来多种分子诊断技术的蓬勃发展为此提供了契机。

1 肺曲霉病传统诊断方法和挑战

1.1 临床表现评估

肺曲霉病临床类型多,临床表现常缺乏明显的特异性。ABPA 主要表现为反复多次阵发性喘息、呼吸困难、咳嗽,常常与支气管炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病等混淆;CPA 主要表现为低热、体重减轻、夜间盗汗、胸痛、咳棕色痰栓和咯血,部分患者可无明显临床症状,如单发曲霉球、曲霉结节患者。有研究报道大约 50% 的 CPA 会出现咯血^[5],若侵及血管,可引起大咯血甚至威胁生命。IPA 的临床表现也缺乏特异性,通常表现干咳、气促、胸膜性胸痛和咯血,发热可有可无。但 IPA 有起病急的特点,病情可能在几天内迅速进展恶化,出现急性呼吸衰竭。

尽管上述临床表现缺乏特异性,但详细的病史收集、病情演变和分析有助于确定患者是否存在肺曲霉病的可能,如呼吸困难的发作规律是否频繁加重,痰液性状、颜色和液量的变化,胸痛特点、咯血情况、规律等。

1.2 影像学特征与价值

影像学检查是临床判断肺曲霉病的重要辅助手段,胸部高分辨率计算机断层扫描在肺曲霉病的诊断效能上优于普通胸部 X 射线。一些影像学表现具有一定的特征性,比如:新月征是 CPA 的特异性表现;晕征是提示存在 IPA 可能^[5-6];中心性支气管扩张伴黏液栓形成对 ABPA 的诊断有益,尤其是在视觉上比骨骼肌更密实的支气管高密度黏液栓有助于鉴别 ABPA 与其他原因引起的支气管扩张^[7]。在影像学上,CPA 的几种类型可存在重叠或部分重叠,如曲霉结节、曲菌球、空洞、纤维化可同时或部分发生于同一患者。此外,CPA 可发展为亚急性 IPA,出现新增实变影,在数天或数周发展为薄壁空洞。

1.3 传统实验室检测

由于肺曲霉病的临床特异性表现不明显,且影像学检查无法明确具体的感染源,实验室检测是目前肺曲霉病诊断的核心。传统的实验室检测包括痰和下呼吸道分泌物涂片和培养、血液或支气管肺泡灌洗的曲霉菌抗原检测、组织病理学检

查等检测方法。

1.3.1 呼吸道分泌物培养

呼吸道分泌物培养是一种诊断肺曲霉病最常用和传统的方法。但不同类型的肺曲霉病的曲霉培养阳性率存在较大差异,呼吸道分泌物培养在 IPA、CPA 和 ABPA 中的阳性率均低于 30%,在曲霉结节中的阳性率甚至低于 10%^[6]。曲霉在呼吸道标本的培养时间为 48~96 h。因此,曲霉培养的低阳性率和长检测周期降低了其在肺曲霉病快速诊断中的价值。

1.3.2 显微镜检查呼吸道分泌物

与呼吸道分泌物培养相比,直接显微镜检查呼吸道分泌物的检测时间更短,但镜检曲霉的阳性率很低,IPA、CPA 中镜检阳性率均低于 10%^[6]。

1.3.2.1 血清曲霉特异性 IgG、IgM 和 IgE 抗体

曲霉特异性 IgG 和 IgM 抗体是机体在感染曲霉菌后产生的特异性抗体。IgG 抗体通常在感染后期产生,参与长期免疫。IgM 抗体在感染的早期产生,参与初始免疫反应。检测这些抗体可以协助诊断肺曲霉病,并监测机体对感染的免疫反应。血液中曲霉菌 IgG 和 IgM 抗体水平均升高表明可能存在活跃的或近期曲霉菌感染。曲霉特异性 IgG 诊断 CPA 的敏感性为 70%~90%,当 IgM 水平高而 IgG 处于正常范围时,提示机体新近感染了曲霉,可能有助于 IPA 的诊断^[5,8]。曲霉特异性 IgE 被认为是诊断 ABPA 的关键标准,尤其是烟曲霉特异性 IgE 水平升高被认为是诊断 ABPA 最敏感的方法^[9]。一项 meta 分析显示,曲霉特异性 IgE 诊断 ABPA 的总体敏感性和特异性分别为 0.83 和 0.89,诊断效能高于其他检测方式^[10]。

1.3.2.2 曲霉抗原检测

曲霉半乳甘露聚糖(GM)抗原检测是检测曲霉感染的经典血清学方法之一。血清 GM 检测诊断 IPA 的敏感性约为 20%~80%,在 CPA 中约为 10%~65%^[6,11],GM 检测诊断 IPA 的特异性约为 78%~90%^[12],在 CPA 中约为 58%^[13]。有研究显示,支气管肺泡灌洗液(BALF)中的 GM 检测比培养和显微镜检测更敏感,诊断效能更好^[14]。但 BALF 的获取需行气管镜侵入性检查,因此与血清相比标本获取更不易。在抗真菌治疗前,BALF GM 检测的敏感性和特异性在 IPA 中约为 80%~90%,在 CPA 中约为 75%。对于痰液 GM 检测,由于痰液中 GM 值远高于血清或 BALF,因此需要单独确定截断值。一项队列研究显示,痰 GM 最佳截断值为 0.71,敏感性和特异性分别为 77%、

78%^[15],而血清和 BALF 的 GM 截断值普遍确定为 0.5 即可获得较高的特异性和敏感性^[13]。GM 检测较传统的微生物学检测手段敏感性更高、耗时更短,但仍然存在敏感性和特异性不够高的问题,比如使用 β -内酰胺类抗生素、肠内营养、使用含有 GM 成分的药物、合并其他重症感染均可出现 GM 检测假阳性,从而影响临床医生对 IA 的诊断,导致抗真菌药物应用不规范。因此,必须认识到 GM 试验假阳性的影响因素,从而指导临床工作。

1.3.2.3 组织病理学检查 明确肺部被曲霉病感染的“金标准”是对感染组织样本进行组织学检查^[16],经支气管或经皮肺穿刺活检,进行苏木精-伊红(HE)染色,或采用吉姆萨染色或六胺银染,曲霉病理特征是具有二分枝的隔膜菌丝和长分生孢子,其尖端携带许多孢子。在组织学标本中,曲霉球表现为发炎、膨胀的隔膜菌丝伴有纤维蛋白、血凝块、细胞碎片和黏液残留物的网状物,中央核心经常出现坏死组织。根据炎症的严重程度和进展时间,可能有慢性肉芽肿性炎症、淋巴滤泡、脓肿、溃疡和纤维化的证据^[17]。

2 曲霉菌分子诊断技术

2.1 曲霉菌聚合酶链反应(PCR)

2.1.1 PCR 检测血液标本筛查 IA 高危患者 由于 PCR 方法学、样本类型和体积、DNA 提取方案、基因靶标、阳性结果判读标准及排除感染的参考标准等存在差异,基于 PCR 诊断 IA 的价值在很长一段时间内并未得到真正的体现。随着近年来分子生物学技术的规范发展,曲霉菌 PCR 在 IA 早期诊断的价值得到开发,尤其是筛查存在血液病的 IA 高危人群。一些学者对曲霉菌 PCR 的诊断性能进行了荟萃分析,其中一项检索了 1 618 例 IA 风险患者共 10 000 多个血液样本数据^[18],结果显示,无论是采用连续 2 次还是单次阳性来定义阳性,确诊病例和疑似病例的 PCR 平均诊断比值比相似,连续 2 次阳性样本的敏感性和特异性分别为 0.75 和 0.87,单次阳性的特异性显著低于 2 次阳性(0.87 vs. 0.75, $P=0.027$),但敏感性没有差异。因此,作者认为单一 PCR 阴性结果足以排除 IA 的诊断,但需要 2 次阳性检测才能确认诊断^[18]。另一项荟萃分析结果显示,单次阳性 PCR 的敏感性和特异性分别为 80.5%(95%CI 72.9%~86.3%)和 78.5%(95%CI 67.8%~86.4%),2 次阳性 PCR 的敏感性和特异性分别为 57.9%(95%CI 36.5%~76.8%)和 96.2%(95%CI 89.6%~

98.6%)^[19]。此研究结果显示,当特定患者群体中 IA 的平均患病率为 13%时,若使用 2 次阳性结果来定义 PCR 阳性事件时,曲霉菌 PCR 的阳性预测值从 36%增加到 70%,阴性预测值则稳定保持在 94%~96%,这意味着 2 次 PCR 阴性结果基本可排除 IA,无需经验性抗真菌治疗^[19]。一项前瞻性研究也证实,PCR 进行 IA 筛查的价值^[20],该研究共筛查 213 例接受造血干细胞移植和化疗的急性白血病患者,在未使用抗真菌药物患者中,PCR 的敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值分别为 71.4%、92.3%、62.5%和 98.3%,在接受抗曲霉菌药物预防或治疗的患者中,阳性预测值降至 5.4%,阴性预测值上升到 100.0%,研究认为 PCR 进行曲霉菌早期筛查适用于未接受抗曲霉菌治疗或预防的患者^[20]。

2.1.2 曲霉菌 PCR 的标准化 为了总体协调和提高 PCR 在曲霉菌感染中的诊断性能和临床有效性,国际医学真菌学会的欧洲曲霉菌 PCR 倡议工作组(EAPCRI)已将曲霉菌 PCR 方法标准化,曲霉菌 PCR 实验室在对全血、血清和血浆进行 PCR 检测时应按照这些标准实施检测^[21],BARNES 等^[22]也正在使用 BALF 验证类似的标准化流程。

关于应使用全血还是血清或血浆标本进行筛查或诊断 IA 的争论仍在继续。与全血相比,血清或血浆的处理在技术上要求较低,更有助于自动化处理,需要较少的标准化,并且降低了污染风险^[23]。一项研究根据 EAPCRI 标准化方法比较了 3 种血液组分(423 份全血、583 份血浆和 419 份血清)的诊断效能,结果显示所有样本的 PCR 阳性均与 IA 相关,在灵敏度方面,血浆最高(91%),依次为血清(80%)、全血(55%);在特异性方面全血最高(96%),明显高于血清(69%)和血浆(53%)^[24]。此研究还进一步评价了不同血液组分的 PCR 检测的诊断效能,结果显示血浆 PCR 测试与全血 PCR 测试的诊断性能相似。因此,在临床工作中,使用 PCR 技术检测一种血液成分中的曲霉菌而不是 2 种血液成分是合理的。基于血浆更容易自动提取 DNA,因此使用血浆进行曲霉菌 PCR 检测更适用于繁忙的临床实验室。

2.1.3 PCR 检测 BALF 标本诊断 IPA 除了使用血液筛查早期 IA 外,使用 PCR 检测 BALF 中的曲霉菌 DNA 也被认为是一种非常有前途的方法^[25]。然而, BALF-PCR 目前无法区分定植和感染,总阳性预测值相对较低(约 72%),在非血液病患者中甚至更低^[26]。

因此,欧洲临床微生物学和传染病学会、欧洲医学真菌学联合会和欧洲呼吸学会联合指南仅适度推荐使用 PCR 诊断 IPA^[17]。然而,阴性 PCR 结果有助于排除 IPA^[27]。一项研究结果显示,通过 PCR 确定 BALF 中的真菌载量可以区分曲霉菌感染和污染,但不能区分侵袭性和非侵袭性^[28]。有 2 项荟萃分析显示,使用 BALF 进行曲霉菌 PCR 诊断 IPA 的总体敏感性和特异性超过 90%,如果严格采用 EORTC/MSG 有关 IPA 的诊断标准,BALF PCR 的敏感性和特异性也可以达到 77%和 94%^[29-30]。当 BALF PCR 与 BALF GM 试验结合使用时,诊断效能将大大提高^[31]。2021 年我国国家呼吸临床研究中心 FENG 等^[5]的一项前瞻性研究也证实,BALF 中曲霉 DNA 的实时 PCR 检测比血液样本更有价值,BALF PCR 检测对 CPA 有很好的诊断价值,与 BALF GM 检测相结合可进一步提高诊断的敏感性和特异性。尽管 BALF PCR 仍存在一些重大问题,例如检测方式流程多样、缺乏标准化,并且制定标准需要更大规模的研究,但使用 BALF 标本进行 PCR 诊断无疑是一种很有前途的诊断方法。

2.1.4 PCR 在真菌诊断中的地位 EAPCRI 建议,曲霉 PCR 测定是检测烟曲霉的首选,但对其他曲霉菌属的检测较差。与病毒和细菌相比,烟曲霉细胞不循环,DNA 的起源和来源仍然不确定。必须确定 DNA 是否来自囊泡(外泌体),才能证明 DNA 的释放与真菌的活跃生长有关,或者其是否由真菌营养阶段降解导致的结果。尽管已尽可能标准化用于检测血液样本中曲霉菌 DNA 的 PCR 方案,但 PCR 也仅被列为修订后的 EORTC/MSG 定义中疑似 IA 的真菌学标准,尚未包含在 EORTC 共识 IPA 的诊断标准中^[5]。曲霉 PCR 检测在筛查高危患者的早期感染及实时诊断确诊感染方面具有实用性。在不久的将来,可能会有越来越多的用于检测临床标本中曲霉 DNA 的商业 PCR 试剂盒,并提供标准化的方法进行质量控制。

2.2 下一代测序(NGS) NGS 技术已越来越多地应用于临床微生物学诊断,目前主要有 3 个应用:全基因组测序(WGS)、靶向基因组测序(tNGS)、宏基因组测序(mNGS)。这些应用正被用于病原体的初步鉴定、微生物耐药性机制检测及医院系统内外生物体的流行病学追踪。

2.2.1 WGS WGS 是对目标生物体的微生物基因

组进行测序和组装的过程,在公共卫生实验室中正变得越来越普遍,可以快速识别和跟踪传染病暴发,同时检测和监测新出现的耐药性菌株。WGS 在临床诊断中用于真菌鉴定的用途不如用于细菌鉴定成熟,但与目前真菌学中可能存在主观因素的形态学鉴定方法相比,WGS 可能更有利^[32]。有学者利用 WGS 鉴定烟曲霉分离株,并研究编码三唑类抗真菌药物靶向蛋白基因突变中的耐药机制,发现 TR34/L98H 突变是三唑类耐药的唯一机制^[33]。还有学者利用 WGS 技术对来自英国和爱尔兰的 218 种烟曲霉分离株进行分子流行病学研究,结果显示三唑类耐药分离株可在环境中传播,还揭示了与伊曲康唑耐药相关的耐药机制^[34]。由此可见,WGS 在研究烟曲霉耐药性和机制、分子流行病学方面具有独特的优势,在临床中可使用 WGS 技术对一些特殊的真菌感染人群进行耐药性检测以科学指导药物选择。

2.2.2 tNGS tNGS 是一种靶向捕获基因的测序技术,首先通过多重 PCR 富集特定病原微生物的基因组,再进行高通量测序,将获得的数据与参考数据库进行比较,以确定样品中是否存在致病微生物。此外,tNGS 可直接扩增与耐药性和毒力相关的基因,从而促进表型基因的检测。与 mNGS 相比,tNGS 在病原体检测中表现出更高的准确性和灵敏度,并且具有成本优势,耗时更少^[35]。在目前市场上,mNGS 的检测成本约为 2 000~4 000 元不等,而 tNGS 仅为 800 元左右。tNGS 技术也存在一些局限性,目前仍是一个相对较新的临床应用,临床数据尚不充足。此外,该技术在识别新病原体或稀有病原体方面可能存在不足^[36]。但 tNGS 同时兼具病原体检测的广泛性、灵敏性及低成本检测,在未来可能成为临床应用更广泛的检查方法。

2.2.3 mNGS mNGS 是使用高通量宏基因组方法对 DNA、RNA 进行测序,理论上具有全面、高效、无需预设等优势。近年来,mNGS 在肺曲霉菌病的诊断中也发挥了重要作用。有研究报道^[37],mNGS 诊断 IPA 的敏感性、特异性和准确性分别为 82.6%、97.7%和 92.5%,与涂片(8.7%, $P < 0.001$)、培养(39.1%, $P < 0.001$)、血清 GM(23.9%, $P < 0.001$)和 BALF GM(69.6%, $P = 0.031$)相比,mNGS 的敏感性优于任何单一常规微生物检测方法;mNGS 能够准确区分曲霉菌属菌株,与培养的一致性为 77.8%;此外,mNGS 具有更高的检出敏感性,在一些阴性培养

病例中鉴定出烟曲霉、黄曲霉、疣曲霉、米曲霉和毛霉菌,序列从 11~1 702 不等。此研究还发现,BALF GM 的光密度指数与 mNGS 的读数呈正相关,这也提示 mNGS 兼具定性和定量功能,是一种可行且非常灵敏的诊断肺曲霉病的方法^[37]。mNGS 检测曲霉菌仍存在以下问题:(1)由于曲霉菌细胞壁较厚,若临床样本处理不完全,曲霉菌的 DNA 提取困难,容易漏检。(2)高宿主 DNA 背景下进行去人源化分析可能会降低 mNGS 检测的灵敏度。(3)环境或健康人类菌群的样本随时可能被污染,引起 mNGS 假阳性,无法区分污染、定植和致病菌,在一定程度上可能会混淆临床医生的视角。(4)缺乏不同病原菌阳性判断标准或阈值,以及微生物检出丰度高与致病菌判断之间的关系尚不明确^[37]。

3 结语与展望

肺曲霉病临床类型和表现相差巨大,发病率严重被低估,提高临床关注、恰当的取样、及时的实验室检测、结合影像学等手段可以明确减少致命真菌疾病的发生和过早的死亡。快速准确的真菌病原学检测,是有效提高肺曲霉病临床诊断率、及时制定治疗方案、改善患者预后的重要措施。NGS、PCR 等分子生物学检测技术较好地弥补了传统诊断技术的不足,但同时也具有局限性,尚不能区分定植、污染与感染,并且这些技术的操作、判断标准与解读还尚未完全规范。随着相关技术和环节的进一步自动化和规范化,分子生物学技术势必会在将来迎来更大的前景与更广的应用。

参考文献

- [1] DENNING D W. Global incidence and mortality of severe fungal disease[J]. *Lancet Infect Dis*, 2024,24(7):e428-e438.
- [2] OTU A, KOSMIDIS C, MATHIOUDAKIS A G, et al. The clinical spectrum of aspergillosis in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Infection*, 2023,51(4):813-829.
- [3] CADENA J, THOMPSON G R, PATTERSON T F. Aspergillosis: epidemiology, diagnosis, and treatment[J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2021, 35(2):415-434.
- [4] AMOTH F, CALANDRA T. Pulmonary aspergillosis: diagnosis and treatment[J]. *Eur Respir Rev*, 2022,31(166):220114.
- [5] YE F, ZENG P, LI Z, et al. Detection of aspergillus DNA in BALF by real-time PCR and galactomannan antigen for the early diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2021,51(5):698-704.
- [6] UO L, WU X, WU X. Aspergillus infection in chronic obstructive pulmonary diseases[J]. *Clin Respir J*, 2023,17(3):129-138.
- [7] ELBABA F, GAO Y Q, SOUBANI A O. Pulmonary aspergillosis: what the generalist needs to know[J]. *Am J Med*, 2020,133(6):668-674.
- [8] JENKS J D, NAM H H, HOENIGL M. Invasive aspergillosis in critically ill patients: review of definitions and diagnostic approaches[J]. *Mycoses*, 2021,64(9):1002-1014.
- [9] GREENBERGER P A, BUSH R K, DEMAIN J G, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis[J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2014, 2(6):703-708.
- [10] LIU A L, CHEN W S, WEI Y N, et al. Comparison of diagnostic efficiency of detecting IgG and IgE with immunoassay method in diagnosing ABPA: a meta-analysis[J]. *BMC Pulm Med*, 2023,23(1):374.
- [11] YOSHIMURA K, SUZUKI Y, INOUE Y, et al. Utility of serum aspergillus-galactomannan antigen to evaluate the risk of severe acute exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *PLoS One*, 2018,13(6):e0198479.
- [12] ARVANITIS M, ANAGNOSTOU T, MYLONAKIS E. Galactomannan and polymerase chain reaction-based screening for invasive aspergillosis among high-risk hematology patients: a diagnostic meta-analysis[J]. *Clin Infect Dis*, 2015,61(8):1263-1272.
- [13] MA X Q, WANG K F, ZHAO X, et al. Prospective study of the serum aspergillus-specific IgG, IgA and IgM assays for chronic pulmonary aspergillosis diagnosis[J]. *BMC Infect Dis*, 2019,19(1):694.
- [14] WU Z W, WANG L, TAN L, et al. Diagnostic value of galactomannan in serum and bronchoal-

- veolar lavage fluid for invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic patients[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2021, 99(4):115274.
- [15] NUH A, RAMADAN N, SHAH A, et al. Sputum galactomannan has utility in the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis[J]. *J Fungi (Basel)*, 2022, 8(2):188.
- [16] MALLATOVA N. Mycological diagnosis of pulmonary aspergillus infections with a focus on serological methods[J]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2017, 66(4):174-181.
- [17] CHAKRABORTY R K, GILOTRA T S, TOBIN E H, et al. Aspergilloma[M]. *Treasure Island: StatPearls Publishing*, 2024:212-216.
- [18] MENGOLI C, CRUCIANI M, BARNES R A, et al. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2009, 9(2):89-96.
- [19] CRUCIANI M, MENGOLI C, BARNES R, et al. Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised people[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2019, 9(9):CD009551.
- [20] SPRINGER J, GOLDENBERGER D, SCHMIDT F, et al. Development and application of two Independent real-time PCR assays to detect clinically relevant mucorales species[J]. *J Med Microbiol*, 2016, 65(3):227-234.
- [21] BULPA P, DUPLAQUET F, DIMOPOULOS G, et al. Invasive pulmonary aspergillosis in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations[J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2020, 41(6):851-861.
- [22] BARNES R A, WHITE P L, MORTON C O, et al. Diagnosis of aspergillosis by PCR: clinical considerations and technical tips[J]. *Med Mycol*, 2018, 56(suppl 1):60-72.
- [23] WHITE P L, BARNES R A, SPRINGER J, et al. Clinical performance of aspergillus PCR for testing serum and plasma: a study by the European aspergillus PCR initiative[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(9):2832-2837.
- [24] SPRINGER J, LACKNER M, ENSINGER C, et al. Clinical evaluation of a mucorales-specific real-time PCR assay in tissue and serum samples[J]. *J Med Microbiol*, 2016, 65(12):1414-1421.
- [25] REICHARD U, BUCHHEIDT D, LASS-FLORL C, et al. Interlaboratory comparison of PCR-based identification of candida and aspergillus DNA in spiked blood samples[J]. *Mycoses*, 2012, 55(5):426-434.
- [26] ARVANITIS M, MYLONAKIS E. Diagnosis of invasive aspergillosis: recent developments and ongoing challenges[J]. *Eur J Clin Invest*, 2015, 45(6):646-652.
- [27] HENG S C, CHEN S C A, 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.
- [28] IMBERT S, MEYER I, PALOUS M, et al. Aspergillus PCR in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis and prognosis of aspergillosis in patients with hematological and non-hematological conditions[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9(1):1877.
- [29] SUN W K, WANG K, GAO W, et al. Evaluation of PCR on bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12):e28467.
- [30] AVNI T, LEVY I, SPRECHER H, et al. Diagnostic accuracy of PCR alone compared to galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a systematic review[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(11):3652-3658.
- [31] 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 (下转第 3935 页)

(2):225-228.

- [22] GOTO Y, WADA K, KONISHI K, et al. Association between exposure to household smoking and dental caries in preschool children; a cross-sectional study[J]. *Environ Health Prev Med*, 2019, 24(1):9-11.
- [23] COLOMBO S, GALLUS S, BERETTA M, et al. Prevalence and determinants of early childhood caries in Italy[J]. *Eur J Paediatr Dent*, 2019, 20(4):267-273.
- [24] NAKAYAMA Y S I, OHNISHI H, MORI M. Association of environmental tobacco smoke with the risk of severe early childhood caries among 3-year-old Japanese children[J]. *Caries Res*, 2019, 53(3):268-274.
- [25] SU H R, YANG R R, DENG Q L, et al. Deciduous dental caries status and associated risk factors among preschool children in Xuhui District of Shanghai, China [J]. *BMC Oral Health*, 2018, 18(1):111-125.
- [26] FISHER-OWENS S A, GANSKY S A, PLATT L J, et al. Influences on children's oral health: a

conceptual model[J]. *Pediatrics*, 2007, 120(3): e510-e520.

- [27] 陈于宁, 姚树桥, 夏良伟. 主观社会经济地位量表中文版测评成人样本的效度和信度[J]. *中国心理卫生杂志*, 2014, 28(11):869-874.
- [28] 陈霜, 曾晓娟, 刘秋林, 等. 家庭环境因素与儿童患龋状况的相关性研究[J]. *口腔疾病防治*, 2018, 22(3):184-188.
- [29] FOLAYAN M O, RAMOS-GOMEZ F, FATU-SI O A, et al. Child dental neglect and legal protections: a compendium of briefs from policy reviews in 26 countries and a special administrative region of China[J]. *Front Oral Health*, 2023, 4(1):1211242.
- [30] KNEBUSCH V, WILLIAMS J, YORDI AGUIRRE I, et al. Effects of the coronavirus disease 2019 pandemic and the policy response on childhood obesity risk factors: gender and sex differences and recommendations for research [J]. *Obes Rev*, 2021, 22(Suppl 6):e13222.

(收稿日期:2024-03-20 修回日期:2024-08-26)

(上接第 3928 页)

the national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (EORTC/MSG) Co[J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 46(12):1813-1821.

- [32] HILT E E, FERRIERI P. Next Generation and other sequencing technologies in diagnostic microbiology and infectious diseases [J]. *Genes (Basel)*, 2022, 13(9):1566.
- [33] ABDOLRASOULI A, RHODES J, BEALE M A, et al. Genomic context of azole resistance mutations in *aspergillus fumigatus* determined using whole-genome sequencing [J]. *Mbio*, 2015, 6(3):e00536.
- [34] RHODES J, ABDOLRASOULI A, DUNNE K T, et al. Population genomics confirms acquisition of drug-resistant *aspergillus fumigatus* infection by humans from the environment[J].

Nat Microbiol, 2022, 7(5):663-674.

- [35] YI X, LU H, LIU X, et al. Unravelling the enigma of the human microbiome: evolution and selection of sequencing technologies[J]. *Microb Biotechnol*, 2024, 17(1):e14364.
- [36] LI B, XU L Y, GUO Q, et al. GenSeizer: a multiplex PCR-Based targeted gene sequencing platform for rapid and accurate identification of major mycobacterium species[J]. *J Clin Microbiol*, 2021, 59(2):e00584.
- [37] SHI Y, PENG J M, HU X Y, et al. Metagenomic next-generation sequencing for detecting aspergillosis pneumonia in immunocompromised patients: a retrospective study [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13(2):1209724.

(收稿日期:2024-02-20 修回日期:2024-08-11)