

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.20.003

2 株临床分离烟曲霉菌株病原学检测及分子鉴定方法比较与分析*

杜伟勤¹, 王淑峰², 薛婷^{3△}

1. 吕梁市人民医院医学检验科, 山西吕梁 033000; 2. 山西医科大学第一医院医学检验科, 山西太原 030001; 3. 山西医科大学第一医院呼吸与危重症医学科, 山西太原 030001

摘要:目的 对 2 株临床分离的烟曲霉菌株进行病原学检测和分子鉴定, 并对不同检测方法进行比较分析。方法 收集 2 例侵袭性肺曲霉病(IPA)患者痰液标本, 采用直接压片、亚甲蓝染色和改良 GMS 染色, 以及分离、培养等病原学检测, 应用 rodA、anx4、 β -tub、ITS、cyp51A 和 cyp51B 基因进行 PCR、环介导等温扩增(LAMP)、分子克隆和 Sanger 测序。结果 痰涂片镜检可见典型的烟曲霉鹿角样菌丝、分生孢子头和分生孢子; 真菌显色培养基上菌落颜色由白色转为蓝绿色; rodA、anx4、 β -tub、ITS、cyp51A 和 cyp51B 与 Genbank 数据库中烟曲霉相应序列的同源性均在 99.7% 以上; LAMP 扩增产物肉眼可见白色沉淀, 琼脂糖凝胶电泳呈典型梯度条带, HNB 可视化检测结果呈淡蓝色, real-time LAMP 呈“S”型扩增曲线。结论 临床疑似烟曲霉感染时, 可通过 LAMP 进行快速分子鉴定, 辅助临床提升诊断效率, 为临床治疗提供依据。

关键词: 烟曲霉; 病原学检测; 分子鉴定; 环介导等温扩增

中图分类号: R446.5; R372

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)20-2937-05

Comparison and analysis of two strains of *Aspergillus fumigatus* from clinical isolates between pathogenic biology and molecular identification*

DU Weiqin¹, WANG Shufeng², XUE Ting^{3△}

1. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Lujiang, Lujiang, Shanxi 033000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 3. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

Abstract: Objective To detect two strains of *Aspergillus fumigatus* from clinical isolates using pathogenic biology and molecular identification, and to compare and analyze the different methods. **Methods** Sputum samples from patients with invasive pulmonary aspergillosis (IPA) were collected. Sputum smears were prepared and detected using direct compression, methylene blue staining method and modified GMS method to observe the morphological characteristics. The fungal isolation and culture techniques of pathogenic biology as well as the fungal chromogenic medium were performed. Meanwhile, conservative genes including rodA, anx4, β -tub, ITS, cyp51A and cyp51B were examined using polymerase chain reaction (PCR), loop-mediated isothermal amplification (LAMP), molecular-cloning and Sanger sequencing. **Results** Typical morphological features of *Aspergillus fumigatus* including hyphae shaped like antlers, conidial heads and conidia. The colony colors of *Aspergillus fumigatus* changed from white to aquamarine blue on the fungal chromogenic medium. Compared with previously published nucleotide sequences of *Aspergillus fumigatus* related genes such as rodA, anx4, β -tub, ITS, cyp51A and cyp51B in the Genbank database, the sequencing results in this study showed that the homology was more than 99.7%. The amplification products of LAMP could be tested by

* 基金项目: 山西省高等学校科技创新项目(2020L0201, 2020L0223); 山西医科大学省级博士启动基金项目(SD1905); 山西医科大学校级博士启动基金项目(XD1905)。

作者简介: 杜伟勤, 男, 主管技师, 主要从事医学病原微生物研究。△ 通信作者, E-mail: beyondtinger@126.com。

本文引用格式: 杜伟勤, 王淑峰, 薛婷. 2 株临床分离烟曲霉菌株病原学检测及分子鉴定方法比较与分析[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(20): 2937-2941.

white precipitate visible to the naked eye, agarose gel electrophoresis showed typical gradient bands, and HNB visual detection results showed light blue, real-time LAMP showed an "S" type amplification curve. **Conclusion**

The rapid and accurate molecular identification could be performed by LAMP from those with suspected *Aspergillus fumigatus* infection in order to improve the efficiency of the auxiliary clinical diagnosis and provide reference for clinical therapy.

Key words: *Aspergillus fumigatus*; detection of pathogenic biology; molecular identification; loop-mediated isothermal amplification

烟曲霉是曲霉菌属中最常见一类机会致病性真菌,呈世界性分布,通过空气传播,可在免疫力低下患者中引起危及生命的侵袭性肺曲霉病(IPA)。唑类抗真菌药物是临床预防和治疗 IPA 的首选药物。近年研究发现,烟曲霉对唑类药物的耐药性日益严峻,且耐唑类药物烟曲霉引起的 IPA 病死率高达 100%^[1]。然而,临床上由于缺乏早期、快速、敏感和有效的烟曲霉检测方法,IPA 患者通常无法及时诊断,进而导致治疗延误。因此,本研究对临床分离的烟曲霉菌株进行病原学检测和分子生物学鉴定,并比较了不同检测方法之间的差异,期望能够辅助临床提升诊断效率,为临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集山西医科大学第一医院临床疑似肺曲霉感染患者痰液标本,经痰涂片、革兰染色镜检,形态学初步鉴定为曲霉菌。

1.2 主要试剂 亚甲蓝染液(珠海贝索生物技术有限公司),六次甲基四胺、四硼酸钠(辽宁永强医药器械化玻有限公司),氯化金溶液(Sangon Biotech 公司),甜菜碱(Sigma 公司),Bst DNA 聚合酶(New England BioLabs),100×羟基萘酚蓝(HNB)溶液(北京百奥莱博科技有限公司),*E. coli* DH5 α 感受态细胞, pMDTM18-T Vector Cloning 试剂盒、Premix TaqTM(Ex TaqTM Version 2.0 plus dye)、DNA Marker、琼脂糖凝胶回收试剂盒(Tiangen 公司)。

1.3 方法

1.3.1 涂片制备及培养 无菌棉签挑取脓性痰液 60~100 μ L 于干燥洁净载玻片右侧 2/3 处,均匀涂抹 10 mm×20 mm 左右卵圆形痰膜,自然干燥;迅速通过酒精灯外焰 3~4 次,加热固定待用。接种环挑取脓性痰液 2 环,直接压片法制备痰液涂片,待镜检。将适量痰液加入 10 mL 无菌生理盐水的离心管中,剧烈振荡 15 s,3 500 r/min 离心 15 min,弃上清;重复上述步骤,接种环取沉淀分别接种于 Sabouraud 培养基和真菌显色培养基,置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中,每天观察菌落生长情况。

1.3.2 亚甲蓝染色 亚甲蓝溶液染色 1 min,双蒸水漂洗,自然干燥后,镜检。

1.3.3 改良 GMS 染色 (1)冰甲醇固定;(2)过碘酸染色 5 min,双蒸水洗 3 次,甩干;(3)载玻片置于加热板上,GMS 工作液覆盖菌膜,加热 3~5 min(此过程中避免 GMS 工作液干涸),直至涂片颜色变为深褐色,冷却后双蒸水洗 3 次,甩干;(4)滴加氯化金溶液,作用约 15 s,菌膜颜色由深褐色变为灰白色,双蒸水洗 3 次,甩干;(5)硫代硫酸钠固定 3 min,双蒸水洗 3 次,晾干,镜检。

1.3.4 提取烟曲霉 DNA 分别取痰液 2 mL,加入 4 倍体积生理盐水洗涤,3 500 r/min 离心 10 min,重复上述步骤 3 次,加入 2 mL 真菌细胞壁裂解液[100 mmol/L Tris-HCl,pH 值 8.0,1.0% 十二烷基硫酸钠(SDS),10 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl]中,剧烈振荡 15 s,静置 5 min,加 10 mg/mL 蛋白酶 K 10 μ L,56 $^{\circ}$ C 6 h,酚-氯仿法提取 DNA。

1.3.5 PCR 扩增 以 1.3.4 中提取的 DNA 为模板,所用引物见表 1,分别进行 PCR 扩增,反应体系为 25 μ L(Premix Taq 酶 12.5 μ L,10.0 mmol/L 引物各 1 μ L,双蒸水 8.5 μ L),扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物并回收。阳性对照为本实验室保存的烟曲霉菌株,阴性对照为无菌双蒸水。

表 1 PCR 扩增引物^[2-4]

| 基因名称 | 引物序列(5'-3') | 产物大小 (bp) |
|--------------|------------------------|--------------|
| rodA | F:ACATTGACGAGGGCATCCTT | 313 |
| | R:ATGAGGGAACCGCTCTGATG | |
| anxC4 | F:CAGTGACGTATGAGAGTC | 148 |
| | R:GGACATAACTGGACCATC | |
| β -tub | F:AATTGGTGCCGCTTTCTGG | 492 |
| | R:AGTTGTCGGGACGGAATAG | |
| ITS | F:GCATCGATGAAGAACGCAGC | 353 |
| | R:TCCTCCGCTTATTGATATGC | |
| cyp51A | F:CTTCTTTGCGTGCAGAGA | 231 |
| | R:GGGGTCGTCAATGGACTA | |
| cyp51B | F:CTTTTTCGACTGCCGCGC | 218 |
| | R:AGGCGTAGTGAGTGGAGA | |

1.3.6 TA 克隆 采用 Nanodrop 分光光度计检测胶回收 DNA 的浓度。10 μ L 反应体系: pMD18-T Vector 1 μ L, DNA (10 ng) 1 μ L, RNase-free Water 3 μ L, Soluision 5 μ L。然后于 16 $^{\circ}$ C 放置过夜, 第 2 天将其加入 E. coli DH5 α 感受态细胞中, 轻弹试管底部混匀, 置于冰上静置 30 min; 42 $^{\circ}$ C 水浴 60 s, 冰浴 1~2 min 后, 加入 890 μ L LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、225 r/min 恒温振荡培养 60 min; 混匀后取 100 μ L, 涂布于含 1 μ g/mL 氨苄西林的 LB 固体培养基上, 待菌液吸收完全, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱过夜培养。菌落 PCR 鉴定所用引物为通用引物, 扩增体系和条件同 1.3.5。琼脂糖凝胶回收后双向测序。

1.4 环介导等温扩增(LAMP)扩增 以 1.3.5 中提取的 DNA 为模板进行 LAMP 扩增, 所用引物见表 2。25 μ L 反应体系如下: 5 μ mol/L F3/B3 各 1 μ L, 40 μ mol/L FIP/BIP 各 1 μ L, 10 mmol/L dNTPs 3.5 μ L, Betaine 2 μ L, 100 mmol/L Mg $^{2+}$ 1 μ L, Bst DNA 聚合酶 1 μ L, 10 \times Thermo Pol Buffer 2.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, 加 Nuclease-free Water 至 25 μ L。扩增条件为 63 $^{\circ}$ C 1 h, 扩增产物分别通过观察白色沉淀, 琼脂糖凝胶电泳, 可视化(在上述反应体系中加入 25 \times HNB 1 μ L)及 real-time LAMP (在上述反应体系中加入 10 μ mol/L SYTO-9.0 0.5 μ L)进行检测。阳性对照为本实验室保存的烟曲霉菌株, 阴性对照为无菌双蒸水。

2 结 果

2.1 病原学检测结果

2.1.1 培养特性 2 株烟曲霉在真菌显色培养基培

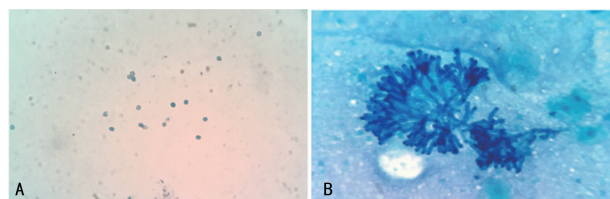
养, 开始为白色菌落; 培养 3 d 后, 菌落边缘呈白色, 中心为蓝绿色; 培养 8 d 后, 菌落呈深绿色。

2.1.2 直接压片法结果 痰涂片直接压片结果可见典型呈 45 $^{\circ}$ 分枝的鹿角样曲霉菌菌丝。

2.1.3 亚甲蓝染色 痰涂片亚甲蓝染色结果见图 1, 可见烟曲霉子囊孢子和典型呈 45 $^{\circ}$ 分枝的鹿角样菌丝。

表 2 LAMP 扩增所用引物^[2]

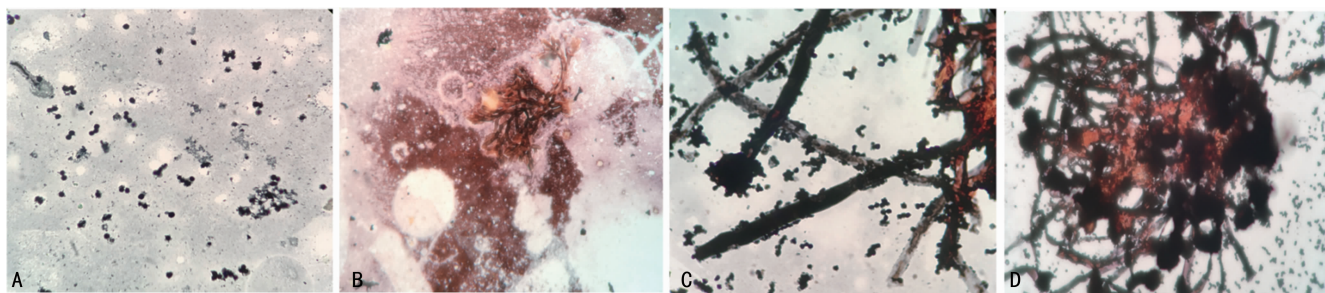
| 引物名称 | 引物序列(5'-3') |
|------|--|
| F3 | AGATACGGACGACGAGGC |
| B3 | TGACCGGAATGTCTCATC |
| FIP | ATCTACGCGAGGCGAGGACGCTAGCGATCTGGAGCGTGAT |
| BIP | GGTCCAGTTATGTCCGGGGCTGAAGCATGACGGGAACG |



注: A 为烟曲霉子囊孢子(\times 400); B 为鹿角样菌丝(\times 400)。

图 1 亚甲蓝染色结果

2.1.4 改良 GMS 染色 改良 GMS 染色结果见图 2, 可见烟曲霉培养物子囊孢子(图 2A), 痰涂片可见典型呈 45 $^{\circ}$ 分枝的鹿角样菌丝(图 2B); 图 2C 和图 2D 分别显示烟曲霉培养物在油镜和 40 倍镜下的烟曲霉顶囊, 呈烧瓶状, 可见分生孢子梗, 偶见分枝。



注: A 为烟曲霉子囊孢子(\times 400); B 为鹿角样菌丝(\times 100); C 为烟曲霉顶囊(\times 1 000); D 为烟曲霉顶囊(\times 400)。

图 2 改良 GMS 染色结果

2.2 分子鉴定结果

2.2.1 TA 克隆测序结果 本研究中分离的 2 株烟曲霉不同基因扩增测序结果分别与 Genbank 已公布序列经 Blast 分析结果显示, rodA 基因的同源性为 100.00%; anxc4 的基因测序结果显示第 30 位存在 T/C 突变, 其与 Genbank 已公布的烟曲霉 anxc4 同源性大于 99.75%(其中 C3 与 KU575847 等同源性为

100.00%, C4 与 KU575763 的同源性为 100.00%)。 β -tub 基因测序结果与 Genbank 已公布的烟曲霉 β -tub 基因同源性为 100.00%(Genebank No. KU714964); ITS 基因测序结果与 Genbank 已公布的烟曲霉 ITS 基因同源性为 100.00%(Genebank No. MT297633); cyp51B 基因测序结果与 Genbank 已公布的烟曲霉 cyp51B 基因同源性为 100.00%(如

MF070895); *cyp51A* 基因测序结果与 Genbank 已公布的烟曲霉 *cyp51A* 基因同源率为 100.00% (如 MT468488)。见表 3。

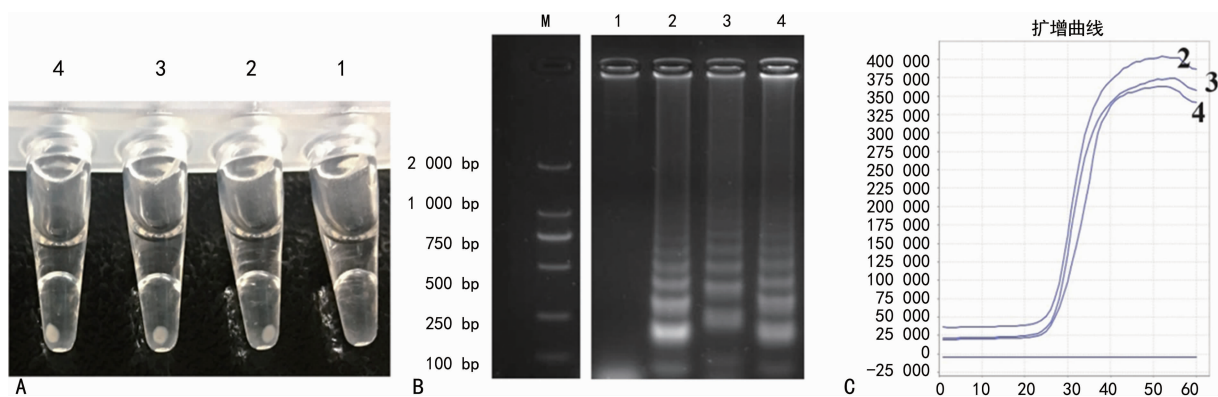
表 3 2 株烟曲霉不同基因同源性分析结果

| 基因 | <i>rodA</i> | <i>anxc4</i> | β - <i>tub</i> | ITS | <i>cyp51B</i> | <i>cyp51A</i> |
|--------|-------------|--------------|----------------------|--------|---------------|---------------|
| 同源性(%) | 100.00 | 99.75 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| 突变位点 | — | 30(T/C) | — | — | — | — |

注：—表示不存在突变位点。

2.2.2 LAMP 检测结果 LAMP 扩增后，离心，可见阴性对照无白色沉淀，阳性对照与本研究收集的标本可观察到白色沉淀；LAMP 反应体系中加入

HNB 溶液，恒温扩增后，可视化检测结果阴性对照为紫色，阳性对照与阳性标本为蓝色；上述扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶进行琼脂糖凝胶电泳，阳性对照与阳性标本为 LAMP 扩增典型梯度条带，阴性对照无条带；real-time LAMP 扩增结果显示，阴性对照无扩增，为一水平直线，阳性对照和阳性标本出现“S”型荧光扩增曲线，见图 3。白色沉淀、HNB 可视化检测结果、琼脂糖凝胶电泳结果与 real-time LAMP 荧光扩增曲线结果一致，提示 LAMP 能准确快速鉴定疑似 IPA 患者呼吸道分泌物中烟曲霉基因。



注：A 为白色沉淀；B 为琼脂糖凝胶电泳结果；C 为 real-time LAMP 检测结果；M 为 DL 2 000 DNA Marker, 1 为阴性对照, 2 为阳性对照, 3、4 为阳性标本。

图 3 LAMP 检测结果

3 讨 论

烟曲霉广泛存在于自然界，是 IPA 最常见的一类机会性致病真菌^[3-4]。近年来，随着烟曲霉易感人群诸如恶性肿瘤、器官移植受者等免疫机能低下患者的增加，IPA 发病率呈逐年上升趋势，其病死率在 50% 以上^[5-6]。快速、准确鉴定烟曲霉，对于严重感染者及时诊断、防治及改善预后至关重要。本研究对本院 2 例疑似 IPA 患者的痰液分别进行普通真菌培养、真菌显色培养、直接压片镜检、亚甲蓝染色镜检、改良 GMS 染色镜检等病原学检测，同时提取其 DNA，应用 *rodA*、*anxc4*、 β -*tub*、ITS、*cyp51A* 和 *cyp51B* 基因进行 PCR、LAMP、TA 克隆、分子鉴定，确定致病菌株为烟曲霉。尽管传统的病原学培养方法检测烟曲霉感染的金标准，但其耗时长，灵敏度低；真菌显色培养菌落颜色虽出现白色—蓝绿色—深绿色的转变，但需要 3~8 d 随时观察菌落生长状况，且不易与其他曲霉菌菌落形态显色区分；直接压片镜检、亚甲蓝染色镜检虽可见烟曲霉子囊孢子和鹿角样菌丝，但较难与其他曲霉菌形态区分，且镜检时菌丝易与黏液混淆；GMS 染色法是检测真菌感染常用的一种染色方法，本研究对传统 GMS 染色方法进行了改良，缩短了染

色时间，镜检可见烟曲霉特征性的顶囊结构，此方法也存在一定局限性，要求检验技术人员具备真菌形态学辨别与鉴定的丰富经验。此外，真菌是实验室常见的污染物之一，病原学检测的特异性并不理想。

rodA、*anxc4*、 β -*tub* 和 ITS 基因都是曲霉菌分子鉴定中研究的热门靶基因，*cyp51A* 和 *cyp51B* 基因与烟曲霉对唑类药物的耐药性相关，也是常用于烟曲霉分子鉴定中的靶基因。本研究分别对临床分离的 2 株烟曲霉的上述基因进行 PCR 扩增、TA 克隆、鉴定、测序，序列分析结果显示，其与 Genbank 已公布烟曲霉上述基因的同源性均大于 99.7%，确定为烟曲霉菌株。PCR 分子鉴定方法较传统病原学方法更快速，且更灵敏，随着 PCR 条件和核酸测定技术不断成熟，其可能成为临床实验室检测并鉴定丝状真菌的一种技术。然而，PCR 分子鉴定方法步骤较多，对临床实验室检验人员以及核酸的质量、纯度、浓度要求较高，且在临床标本的评估中存在较大局限性，阻碍了基于 PCR 技术在临床实验室应用的推广和发展。尽管针对 PCR 扩增产物直接测序更加迅速，但为避免直接测序结果中存在某些突变位点是否由于 PCR 扩增本身所引起。本研究通过 TA 克隆后再进行测序，保证

了测序结果的可靠性。此外,基因突变的原因复杂,遗传因素、机体自身或是 PCR 扩增过程均可导致碱基的缺失、置换和插入等,且随着 Genbank 数据库中相似核苷酸序列的逐年更新,序列同源性比对的解读、分析与鉴定更为困难。因此,以病原形态学检测方法为基础,进一步应用 PCR 的分子鉴定技术确定烟曲霉较可靠。

LAMP 是 2000 年 NOTOMI 等^[7]设计并建立的一种恒温、快速、灵敏的分子生物学核酸扩增诊断技术,随着该技术的不断发展与完善,其广泛应用于临床传染性和非传染性疾病的分子诊断,预计其可替代 PCR 技术,并且对于将来实现全民健康覆盖(UHC)具有十分重要的价值^[8]。本研究以烟曲霉 *anxc4* 为目的基因,且选择使用经验证特异性强、检测灵敏度高的 LAMP 扩增引物,通过将 LAMP 扩增技术与传统烟曲霉病原学检测方法和 PCR 技术进行比较,结果显示其可在 63 °C 1 h 内进行扩增,并同时扩增产物进行检测,表明其可快速、有效鉴别烟曲霉菌株。LAMP 技术简单、高效、快捷,其扩增效率高于 PCR,能满足低拷贝数标本的检测^[2-6],且该方法对操作技术、仪器设备、标本处理的要求较低。其他实验室检测诸如血清和支气管肺泡灌洗液(BALF)中半乳糖甘露聚糖(GM)和 1,3-β-D-葡聚糖检测(G)的检测,虽然对于 IPA 患者的诊断具有重要的临床意义^[9-11],但仅有约 50% 的检测结果显示与病原学检测结果相匹配^[12],且特异性较差。此外,欧洲癌症研究和治疗组织/侵袭性真菌感染协作组(EORTC/MSG)对 IPA 诊断标准仍依赖于组织病理学和传统病原学培养方法,然而在临床实践中,疑似 IPA 患者体质较弱,往往不耐受侵入性操作,不利于 IPA 患者的早期诊断。因此,LAMP 技术适用于早期烟曲霉感染者的临床实验室鉴定。

综上所述,传统病原学鉴定烟曲霉的方法存在耗时长、灵敏度低等局限性,PCR 和 LAMP 分子诊断技术较传统方法反应迅速且灵敏度高,LAMP 技术较 PCR 操作简单。因此,LAMP 技术更适用于临床实验室对 IPA 患者呼吸道分泌物中烟曲霉的早期鉴定,可辅助提升临床 IPA 的诊断效率,为临床治疗提供依据。此外,进一步阐明烟曲霉结构、功能、耐药性及耐药机制对抗真菌药物的设计与开发具有重要意义。

参考文献

[1] MEIS J F, CHOWDHARY A, RHODES J L, et al. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Bi-*

ol Sci, 2016, 371(1709): 20150460.

[2] TANG Q, TIAN S, YU N, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Aspergillus fumigatus*[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(4): 950-955.

[3] BALAJEE S A, GRIBSKOV J L, HANLEY E, et al. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*[J]. *Eukaryot Cell*, 2005, 4(3): 625-632.

[4] ZARRIN M, RASHIDNIA Z, FARAMARZI S, et al. Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* using beta-tubulin and rodletA genes[J]. *Open Access Maced J Med Sci*, 2017, 5(7): 848-851.

[5] KOUSHA M, TADI R, SOUBANI A O. Pulmonary aspergillosis: a clinical review[J]. *Eur Respir Rev*, 2011, 20(121): 156-174.

[6] BALLOY V, CHIGNARD M. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* [J]. *Microbes Infect*, 2009, 11(12): 919-927.

[7] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63.

[8] MORI Y, NOTOMI T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage[J]. *J Infect Chemother*, 2020, 26(1): 13-17.

[9] MUSER B, FREDRICKS D, LEISENRING W, et al. *Aspergillus galactomannan* enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(12): 5517-5522.

[10] HUSAIN S, CLANCY C J, NGUYEN M H, et al. Performance characteristics of the platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay for detection of *Aspergillus galactomannan* antigen in bronchoalveolar lavage fluid[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(12): 1760-1763.

[11] FRANCESCONI A, KASAI M, PETRAITIENE R, et al. Characterization and comparison of galactomannan enzyme immunoassay and quantitative real-time PCR assay for detection of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluid from experimental invasive pulmonary aspergillosis[J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(7): 2475-2480.

[12] WALSH T J, WISSEL M C, GRANTHAM K J, et al. Molecular detection and species-specific identification of medically important *Aspergillus* species by real-time PCR in experimental invasive pulmonary aspergillosis [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(12): 4150-4157.