

# 侵袭性真菌感染快速检测河南专家共识

河南省微生物学会临床微生物专业委员会, 河南省医学会微生物与免疫学分会

**摘要:** 侵袭性真菌感染的实验室诊断是临床检验与临床其他专业共同关注的焦点, 国际与国内各学会就真菌病原学诊断做了许多重要的总结与共识, 但侵袭性真菌感染的实验室诊断往往囿于传统检测方法, 速度比较慢, 不能满足临床需要。为促进河南地区临床微生物学科发展, 河南省微生物学会临床微生物专业委员会联合河南省医学会微生物与免疫学分会共同组织专家编写本共识。共识主要包括侵袭性真菌感染快速检测的检测技术、样本采集、性能验证和质量控制、生物安全要求等内容, 为河南省不同类型医疗机构尤其是基层医疗机构侵袭性真菌感染快速检测提供了推荐意见, 以便各级医疗机构规范使用, 更好地服务患者。

**关键词:** 侵袭性真菌感染; 快速检测; 专家共识

中图分类号: R446.5 doi: 10.3969/j.issn.1004-437X.2024.16.001

## Expert Consensus on Rapid Detection of Invasive Fungal Infection in Henan Province

Clinical Microbiology Division of Henan Society of Microbiology, Microbiology and Immunology  
Branch of Henan Medical Association

**Abstract:** Laboratory diagnosis of invasive fungal infection is the focus of clinical examination and clinical specialties. International and domestic societies have made many important summaries and consensus on the diagnosis of fungal etiology. However, laboratory diagnosis of invasive fungal infection is often limited by the slow speed of traditional detection methods, which cannot meet clinical needs. In order to promote the development of clinical microbiology in Henan province, the Clinical Microbiology Division of Henan Society of Microbiology and the Microbiology and Immunology Branch of Henan Medical Association jointly organized experts to compile this consensus. The consensus mainly includes the detection technology, sample collection, performance verification and quality control, and biosafety requirements for the rapid detection of invasive fungal infections, and puts forward recommendations for the rapid detection of invasive fungal infections in different types of medical institutions in Henan province, especially grass-roots medical institutions, so that medical institutions at all levels can standardize their use and better serve patients.

**Key words:** invasive fungal infection; rapid detection; expert consensus

常见的侵袭性真菌感染(invasive fungal infections, IFI)是由念珠菌属、曲霉属、隐球菌属和肺孢子菌属等真菌引起的。每年约 190 万人患有急性 IFI, 约 300 万人患有慢性严重真菌感染, 超过 160 万人死于真菌感染, IFI 的全球负担呈现上升趋势<sup>[1]</sup>。在我国, 引起下呼吸道、耳部和眼部感染的主要霉菌分别为烟曲霉、土曲霉和镰刀菌属, 曲霉属作为霉菌感染的主要菌种占比高达 84.8%, 青霉属、镰刀菌属、毛霉目及赛多孢霉属占比分别为 5.1%、3.0%、1.3% 和 0.4%<sup>[2]</sup>。但目前尚无河南地区真菌流行病学数据的系统性报道。

随着诊疗技术的不断进步, IFI 的流行病学也在逐渐发生着变化, 新患者群体的出现(如流感或 SARS-CoV-2 感染后等)、新的真菌种属的检出(如耳念珠菌等)以及耐药真菌的发现(如唑类耐药曲霉等)对 IFI 的诊断和治疗提出了新挑战<sup>[3]</sup>。早期和准确的病

原学诊断在遏制真菌感染初始阶段中发挥着至关重要的作用, 只有寻求真菌快速、准确的检测技术, 提高真菌感染性疾病诊断效率, 才能最大程度满足临床需求。本共识强调了快速的非培养方法(如涂片染色、真菌抗原及抗体检测、核酸检测等)的应用, 为本地区快速真菌检测项目选择提供依据。

## 1 检测技术

IFI 发病率高且预后差, 早期诊断对于 IFI 的治疗及预后的改善尤为重要。目前, IFI 的实验室快速诊断方法主要有显微镜检查、免疫学检测和分子生物学检测技术等<sup>[4]</sup>。

### 1.1 显微镜检查

显微镜检查快速、直观, 操作相对简单, 标本类型广泛, 是快速诊断 IFI 的传统方法之一, 缺点是需要具有丰富镜检经验的专业人员操作, 阳性率相对较低, 阴性结果不能排除相关诊断<sup>[5]</sup>。常见的方法有氢氧化钾(KOH)法、墨汁染色、荧光染色、六胺银染色等, 详见表 1。

### 1.1.1 KOH 法

KOH 法广泛适用于痰液、毛发、组织等多种标本,操作方便快捷(5 min),相较于革兰氏染色阳性率高,适用于大多数真菌的检测,但镜下背景干扰大,需经过培训、有经验的专业人员观察结果。

### 1.1.2 墨汁染色

墨汁染色简单快速(5 min),易观察,适用于有荚膜的真菌。除脑脊液外的其他细胞含量高的标本如痰液,用 KOH 消化后再做墨汁染色更易于菌体的检出,但该方法灵敏度低,染色前标本应做离心沉淀等前处理。

### 1.1.3 荧光染色

该染色技术适用于所有真菌,简单、快速(5 min)、

易观察,但需荧光显微镜或装有荧光模块的显微镜观察。镜检过程中真菌孢子和菌丝需与弹性纤维、植物纤维、脂肪滴等相区别<sup>[6]</sup>。

### 1.1.4 六胺银染色

六胺银染色是特殊染色中常用的真菌染色方法之一,是目前检测肺孢子菌包囊的较好方法,染色后的包囊在油镜下呈圆形或椭圆形,囊壁染成褐色或黑色,多塌陷呈捏扁的乒乓球样外观。该染色方法也可用于其他真菌染色,其他真菌的孢子或菌丝一样呈现褐色或黑色。对于肺孢子菌,该染色与瑞氏染色或瑞姬氏染色相比,结果易观察,阳性率高,但操作复杂且耗时长,往往需要 2 h 左右,需要经过培训、有经验的专业人员进行染色和观察结果。

表 1 标本显微镜检查不同染色方法比较

染色技术	耗时	用途	优点	缺点	建议
KOH 法	5 min	酵母菌和丝状真菌	操作简单、耗时短	背景干扰大,需要有经验的工作人员操作	根据不同类型标本选择不同浓度的 KOH 溶液,并通过酒精灯外焰或者已工作电热灭菌器上方稍加热使标本加速溶解
墨汁染色	5 min	隐球菌属	操作简单、耗时短、易观察	敏感性低	脑脊液离心取沉淀标本涂片;痰液等非脑脊液标本最好经 KOH 溶液消化后再染色
荧光染色	5 min	所有真菌	操作简单、耗时短、易观察	需要荧光显微镜,假阳性率高,成本高	结合其他染色和免疫检测技术快速判断,染色后应尽快阅片,以免染液干涸影响观察
六胺银染色	1~2 h	耶氏肺孢子菌及其他真菌	相对阳性率高	成本高,操作复杂,用时较长,需要专业人员阅片	建议一张涂片固定位置同时加入质控菌株一起染色,便于判断是否染色成功

## 1.2 免疫学检测

### 1.2.1 半乳甘露聚糖(galactomannan, GM) 试验

GM 是一种曲霉菌细胞壁的多糖抗原成分,随着曲霉菌侵袭性感染过程不断增殖,可在患者血清或其他体液中检测到,被认为是侵袭性曲霉病(invasive aspergillosis, IA) 早期诊断的生物标志物<sup>[7]</sup>。目前检测方法包括胶体金法、免疫荧光层析法(immunofluorescence assay, IFA)、化学发光免疫分析法(chemiluminescence immunoassay, CLIA) 和酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent sandwich assay, ELISA) 等<sup>[8]</sup>。操作方面,ELISA 法、CLIA 法均为自动加样自动检测,而胶体金法、IFA 法需人工加样。检测时间方面,胶体金法用时最短,其次是 IFA 法。检测通量方面,胶体金法、IFA 法均为单人份;其中胶体金法无需检测仪器,肉眼观测结果,更适合基层医院。见表 2。

2019 年欧洲癌症研究及治疗组织和真菌研究组教育与研究共同体(European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium, EORTC/MSGERC) 指南推荐血液、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 和脑脊液的曲霉 GM 试验阳性用于疑似 IA(尤其是中性粒细胞减少、血液恶性疾病、化疗

以及接受造血干细胞移植患者)的诊断<sup>[7]</sup>。建议动态监测,注意不同样本的判断阈值不同<sup>[9-10]</sup>。

应用半合成青霉素类药物如哌拉西林/他唑巴坦等治疗<sup>[11]</sup>、黏菌素吸入治疗等<sup>[12]</sup>、静脉注射含有半乳甘露聚糖成分的药物、输血、马尔尼菲篮状菌、隐球菌等可能是导致假阳性结果的原因<sup>[13]</sup>。假阴性可见于应用抗真菌药物、病情较轻、抗原浓度低等情况<sup>[9]</sup>。

### 1.2.2 曲霉抗体检测

曲霉特异性抗体的检测是变应性支气管肺曲霉病(allergic bronchopulmonary aspergillosis, ABPA) 和慢性肺曲霉病(chronic pulmonary aspergillosis, CPA) 诊断途径的重要组成部分<sup>[14]</sup>;曲霉特异性 IgE 是 ABPA 特征性的诊断指标<sup>[15]</sup>,曲霉特异性 IgG 抗体检测在 CPA 的诊断和治疗监测中起着关键作用<sup>[16]</sup>。曲霉抗体检测在侵袭性曲霉病诊断中的应用价值有限,但可作为免疫功能良好或非中性粒细胞减少性个体的非侵袭性疾病的诊断标志物<sup>[14]</sup>。曲霉特异性抗体检测方法包括 IFA 和 CLIA,均为 1 h 内出结果(见表 2)。假阳性的原因有应用血液制品、免疫球蛋白治疗、球孢子菌、组织胞浆菌感染和支气管曲霉定植等<sup>[14]</sup>。应用抗真菌药物、患者免疫力低下可导致假阴性<sup>[16]</sup>。

表 2 GM 试验和曲霉抗体试验不同方法学对比

方法	检测项目	检测时间	检测通量	急诊功能	操作	设备成本
胶体金法	GM 试验、IgG 抗体试验	10 min	单人份	随到随检	加样后静置 10 min, 直接观察结果	无
IFA	IgE 抗体试验、IgG 抗体试验、GM 试验	30 min	单人份	随到随检	加样后静置 20 min, 上机直接获取检测结果	低
CLIA	IgE 抗体试验、IgG 抗体试验、GM 试验	30 ~ 50 min	各厂家通量不同	随到随检, 插入急诊	样本上机后, 直接获取检测结果	高
ELISA	GM 试验、IgG 抗体试验	2.5 h (批次)	96 个/批次	可进行批次添加	样本上机后, 直接获取检测结果	高

注: IFA 为免疫荧光层析法; CLIA 为化学发光免疫分析法; ELISA 为酶联免疫吸附试验; GM 为半乳甘露聚糖。

1.2.3 G 试验

G 试验是大多数真菌细胞壁的重要组成部分, 除毛霉目和一些担子菌酵母(如隐球菌属)外的大部分 IFI 在血清中均可检测到<sup>[17]</sup>。G 试验方法有浊度法、显色法和化学发光法。显色法的灵敏度及报告速度优于浊度法; 化学发光法需与全自动化学发光仪配套使用, 具有操作简单、快速、准确的优点。详见表 3。

G 试验的敏感性和特异性取决于真菌病原体 and 所检测的潜在患者群体, 具有较高的阴性预测值<sup>[17]</sup>。

表 3 G 试验不同方法学对比

方法	检测时间	急诊功能	应用场景
显色法	60 min 左右	可进行批次添加	三级医院、区域检验中心、第三方实验室
浊度法	90 min 左右	可进行批次添加	临床实验室、基层医院
化学发光法	不同厂家产品有差异	随到随检、插入急诊	根据不同通量适用于三级医院、基层医院

1.2.4 念珠菌甘露聚糖抗原(Candida mannan antigen, Mn)及念珠菌抗体

甘露聚糖占念珠菌细胞壁多糖结构的 32% ~ 36%<sup>[19]</sup>, 念珠菌抗体包括抗念珠菌甘露聚糖(anti-Mn)抗体、抗白念珠菌胚管菌丝壁蛋白 1 抗体、抗白念珠菌芽管抗体、抗白念珠菌烯醇化酶抗体、抗果糖二磷酸缩酶 1 抗体。常采用 ELISA 竞争法检测 Mn; 常见的念珠菌抗体检测方法为间接法 ELISA。两种检测方法均可在 3 h 内报告结果, 且可批量操作。

与血培养相比, Mn 和 anti-Mn 的检测诊断时间可提前 6 ~ 7 d<sup>[20]</sup>, 建议二者联合检测, 可提高其敏感性<sup>[21]</sup>, Mn 和 anti-Mn 联合检测适用于念珠菌血症和慢性播散性念珠菌病<sup>[6, 22]</sup>。抗白念珠菌芽管抗体检测诊断侵袭性念珠菌病特异性高, 敏感性低, 联合 G 试验或 Mn 检测可提高诊断的准确性。

anti-Mn 检测假阳性见于应用抗病毒药物如伐昔洛韦、阿昔洛韦, 既往感染过念珠菌或大量念珠菌定植的患者; 假阴性见于免疫功能低下患者<sup>[17, 20]</sup>。该试验需购置相关仪器设备及专业技术人员操作。

表 4 不同 CrAg 检测方法的干扰因素分析

方法	假阳性因素	假阴性因素	交叉反应
LA	类风湿因子阳性、结核病、人类免疫缺陷病毒、恶性肿瘤、犬咬二氧化碳嗜纤维菌感染	弱荚膜隐球菌的变体 <sup>[28]</sup>	白吉利毛孢子菌、真毛皮肤毛孢子菌、阿萨希毛孢子菌、粘滑口腔球菌、玉米黑粉菌
LFA	—	后带现象、抗原浓度低、低温保存、弱荚膜隐球菌的变体 <sup>[28]</sup>	阿萨希毛孢子菌、玉米黑粉菌
ELISA	—	—	白吉利毛孢子菌、阿萨希毛孢子菌

注: LA 为乳胶凝集试验; LFA 为侧向流层析法; ELISA 为酶联免疫吸附试验; CrAg 为隐球菌荚膜抗原。

G 试验真阳性结果的置信度随着阳性检测重复次数和远高于阳性阈值的数值增加而增加<sup>[7]</sup>。

G 试验的干扰因素较多, 体液中存在葡聚糖酶、使用棘白菌素类药物、近平滑念珠菌引起的菌血症等<sup>[18]</sup>可导致假阴性; 标本溶血、黄疸、乳糜、内毒素污染及使用血液制品(白蛋白、凝血因子等)、半合成青霉素(阿莫西林/克拉维酸等)、链球菌败血症、铜绿假单胞菌或诺卡菌属等引起的感染、某些中药制剂(香菇多糖、双黄连、裂褶菌多糖等)、透析后等可导致假阳性。

1.2.5 隐球菌荚膜抗原(Cryptococcal capsular antigen, CrAg)检测

隐球菌病临床表现无特异性, 影像学呈多样性, 易误诊和漏诊, 致使病情恶化<sup>[23]</sup>。CrAg 检测有高敏感性和高特异性等优点, 可在症状出现之前或疾病发展为隐球菌性脑膜炎之前显示阳性<sup>[24]</sup>, 可作为隐球菌病的早期快速诊断方法, 同时通过对其抗原滴度进行检测可以评估隐球菌病的严重程度和疾病进展情况。CrAg 检测方法包括乳胶凝集试验(latex agglutination, LA)、ELISA 和侧向流层析法(lateral flow assay, LFA), LFA 又包括胶体金免疫层析法和荧光免疫层析法。

LA 因方法学的局限性及商品化试剂盒的检测效果差异等因素, 对比其他检测方法有较多干扰因素。ELISA 具有很好的特异度和敏感度, 影响因素少。LFA 检测周转时间短(< 10 min), 操作简单, 对实验条件要求低, 灵敏度高<sup>[14, 25]</sup>, 有数据表明血清、血浆和全血进行 LFA 检测一致性好<sup>[26]</sup>, 但对于尿液标本敏感性低, 假阳性率高<sup>[27]</sup>。3 种方法中 WHO 建议优先考虑 LFA<sup>[14]</sup>。不同检测方法的干扰因素分析见表 4。

ELISA 检测 CrAg 操作繁琐,检测时间长,需要购置相关的仪器设备,且试验需要专业技术人员操作,适用于医院检验科、第三方实验室、体检中心等;而 LA 和 LFA 操作简单,往往无需仪器设备或者小型便携式设备,对专业技术水平要求不高,适用于医院检验科、门诊、急诊、卫生服务中心、体检中心、第三方实验室等。

### 1.3 分子生物学检测技术

#### 1.3.1 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术

荧光定量 PCR 具有较高的灵敏度和特异性,是最基本和最广泛的检测方法,已用于多种 IFI(曲霉、肺孢子菌、念珠菌)的检测中。血液和 BALF 的曲霉菌 PCR 检测也已被纳入 EORTC/MSGERC 共识指南中,为 IA 的真菌学标准<sup>[29]</sup>。虽然多种样本都可以用于曲霉菌 PCR 检测,但它们的效用却有很大不同。从诊断角度来看,来自感染部位的样本(如 BALF、脑脊液或组织)的曲霉菌 PCR 检测诊断性能更高,灵敏度也高于血液,而且 BALF、脑脊液或组织的 PCR 检测受抗真菌预防或治疗的影响较小<sup>[30]</sup>。至少两次全血或血清样本的曲霉菌 PCR 检测阳性对于高危人群具有一定的诊断价值<sup>[31]</sup>,但是,其性能受到许多因素的影响,例如预防性或治疗性抗真菌药物的使用及类型和程度,疾病情况等<sup>[30]</sup>。从筛查角度来看,血液的曲霉菌 PCR 检测具有可以进行连续采样的优势,而且多次的血液 PCR 检测阴性具有较高的阴性预测值<sup>[31]</sup>。

在 EORTC/MSGERC 共识指南中,曲霉菌 PCR 检测与抗原检测相结合被认为是最佳应用<sup>[31]</sup>。当 BALF 抗原/PCR 联合检测时,虽然使敏感度提高了 5% ~ 9%,但特异性仍足以确认 IA<sup>[32]</sup>。当血液抗原/PCR 联合检测时,如果两项检测均呈阴性,则敏感度(99%)足以排除 IA,而两项检测均呈阳性时的特异性可高达 98%<sup>[33]</sup>。当血液和 BALF 联合检测时,如两者检测结果均呈阳性时可增加疑似 IA 病例的确定性,相反,如果检测均呈阴性,则可以基本排除 IA<sup>[29]</sup>。

荧光定量 PCR 在非曲霉菌感染的其他真菌病病原体检测方面也有其应用前景。如念珠菌 PCR 检测在深部念珠菌病患者中比血培养更敏感,并且当与血培养联合使用时,显著提高了血培养检测侵袭性念珠菌病的能力<sup>[34-36]</sup>。而且,念珠菌 PCR 检测具有较高的阴性预测值,有助于排除念珠菌属引起的血源性感染,从而允许早期停止预防性或经验性抗真菌治疗<sup>[36]</sup>。又如血清毛霉菌 PCR 检测是一种非侵入性技术,可以提供中等证据来确诊或排除毛霉菌病,并有助于确诊病例早期接受靶向抗真菌治疗,而且随访血清中毛霉菌 DNA 负荷也可有助于治疗的管理<sup>[37]</sup>。

荧光定量 PCR 检测可以定量,也可进行多重靶标

检测。但该方法也有一定的局限性,比如需要特殊的仪器设备以及特殊的环境和场地,需要专业技术人员进行操作。检测过程易污染,且缺乏标准化的操作技术和评估方案。对于一些真菌如肺孢子菌,阈值不明确,低拷贝需结合临床、影像、其他实验室检查。

#### 1.3.2 宏基因组下一代测序技术 (metagenomic next generation sequencing, mNGS)

mNGS 是通过直接提取临床样本中的核酸进行文库构建和高通量测序,利用生物信息学算法分析样本中包含的病原微生物序列的种类及耐药基因和毒力基因的一项技术。与传统检测方法比较,mNGS 可以检测传统方法难以检测的真菌病原体(如肺孢子菌),且对曲霉菌的检出率高于传统检测方法,但传统检测方法对白念珠菌和热带念珠菌的检出率更高,mNGS 在隐球菌肺炎检测中无明显的诊断优势<sup>[38-39]</sup>。与使用血液样本相比,使用支气管肺泡灌洗液样本的 mNGS 更适合检测真菌,但两种样本类型的特异性差异无统计学意义<sup>[39]</sup>。解释 mNGS 结果时,需综合考虑患者病史、临床表现、影像学、常规病原学检测结果等。由于技术复杂、检测成本较高、报告解读困难等局限性,mNGS 不作为常规检测推荐。

#### 1.3.3 其他

目前,真菌核酸检测技术还有即时检验核酸、靶向下一代测序技术等,这些技术在 IFI 的检测中具有一定的应用前景,但是关于核酸检测用于真菌感染快速诊断的研究还未成熟,尚不能替代常规微生物学、血清学和组织病理学检查<sup>[40]</sup>。

## 2 样本采集

临床微生物样本的正确采集与处理对检测结果非常重要<sup>[41]</sup>。样本采集根据部位可以分为有菌部位和无菌部位采集。有菌部位样本的采集要尽量减少正常菌群的干扰;无菌部位样本的采集一定要严格遵从无菌操作,避免污染。根据性状可以分为液体样本、脓液黏液性样本和组织样本。液体样本 > 1 mL 需离心后使用,上清液适用于抗原抗体等检测项目,沉渣适用于镜检培养等检测项目;带有脓液、黏液或血性状的样本宜挑取有明显病变性质部分进行检测;组织样本收到后需研磨或超声破碎处理后进行检测。

采集后的样本应尽快送至实验室,多数样本应在 2 h 内送到,样本量小的应在 15 ~ 30 min 内送到,不同样本的保存、运送和注意事项有不同的要求<sup>[41]</sup>。内容详见表 5。

样本采集和预处理。(1)全血/血清/血浆:采集适量静脉血,根据检测项目使用全血或离心取血清/血浆。(2)脑脊液:严格无菌操作,尽可能多地收集脑脊液,样本总量不能少于 1 mL,置于无菌容器中立即送

检<sup>[41]</sup>。(3)呼吸道(咳出痰、抽出痰和肺泡灌洗液)。咳出痰:采集前应交代患者刷牙漱口,戴义齿的患者应摘掉,采集时用力咳出深部合格痰,尽可能采集晨痰。抽出痰应由专业人员使用一次性无菌吸痰管推进气管内抽吸采集,置于无菌容器中送检;要求痰液量 $\geq 0.5$  mL,操作时建议挑取含脓液、黏液、血液部分<sup>[42]</sup>。肺泡灌洗液:气管镜留取肺泡灌洗液样本( $>5$  mL),送至实验室后离心,取上清液( $>0.5$  mL)做抗原抗体检查,沉渣做涂片或其他检测。样本采集后应在 2 h 内尽快送到实验室。(4)胸腔积液、腹腔积液、心包积液、关节腔积液等无菌体液。由专业人员无菌操作穿刺采集胸腔积液、腹腔积液、心包积液、关节腔积液等无菌体液( $>1$  mL),置于无菌容器中立即送检。(5)组织。无菌操作采集伤口基底部的坏死组织 $>1$  g,置于无菌容器中,滴加几滴生理盐水防止干燥立

即送检;不能及时送检应室温保存<sup>[43]</sup>。(6)尿液。采集晨尿(中段尿)、耻骨上联合穿刺尿液或者导管尿液 3~4 mL,置于无菌容器中立即送检。(7)皮肤、疱液、鼻窦、眼部、皮屑、甲屑、毛发等。采集样本时应先用打湿的无菌拭子去除表面分泌物、脱落的皮屑等,再采集病变处样本,置于无菌容器中立即送检。

疱液量大时可选择注射器采集;疱液量小,应先消毒周围皮肤,尽可能多地收集疱液;鼻窦部应采集组织或抽吸脓液;眼部应采集病变处分泌物;皮屑、甲屑、毛发样本应尽可能采集病变处组织或病变边缘位置。

说明:非无菌部位的样本建议涂片和培养同时检测,无菌部位的样本建议同时送涂片、培养和相关抗原抗体检查,无菌样本还可同时将 3~5 mL 注入真菌培养瓶培养。

表 5 不同类型的样本采集、储存和注意事项<sup>[42-43]</sup>

样本类型	采集量	保存温度及时间	注意事项
血清/血浆	静脉血 4 mL	2~8 °C, $\leq 24$ h	建议空腹时、静脉给药前或者病情进展时采集样本
脑脊液	$\geq 1$ mL	不可冷藏,15 min 内送检,延迟送检应室温保存, $\leq 24$ h	腰穿采集时,建议用第 2 管做病原学检查;尽可能多收集脑脊液,可以提升培养的阳性检出率
痰液	$\geq 0.5$ mL		
肺泡灌洗液	$>5$ mL	2~8 °C, $\leq 24$ h	避免被上呼吸道菌群污染
胸腔积液、腹腔积液、心包积液、关节腔积液等无菌体液	$>1$ mL	2~8 °C, $\leq 24$ h	尽可能在抗菌药物使用前采集
组织	新鲜肉芽组织 $>1$ g	应在 15 min 内送检,否则应室温保存, $\leq 24$ h	尽可能在抗菌药物使用前采集
尿液	3~4 mL	2~8 °C, $\leq 24$ h	因存在着极大的污染可能,禁止从集尿袋中采集样本 <sup>[41]</sup> ;不应采集 24 h 尿液
皮肤疱液、鼻窦、眼部、皮屑、甲屑、毛发等	尽可能采集病变处或病变边缘位置	室温保存, $\leq 24$ h	由专业人员无菌操作采集,样本量少时,应避免拭子采集,此时建议床旁完成样本收集和涂片等

### 3 性能验证和质量控制

#### 3.1 性能验证

在临床应用前或任何严重影响检验程序分析性能的情况发生后、检验程序重新启用前,实验室应对检验程序进行独立性能验证。验证检验程序的性能指标,应与检验结果的预期用途相关。

##### 3.1.1 真菌形态学检查性能验证

染色方法:由本岗位人员进行菌株传代、菌落涂片、染色和镜检,填写性能验证记录表,明确记录各种染色方法的实际性能特点<sup>[44]</sup>。显微镜检查:由本岗位人员进行涂片、染色、镜检及结果报告,由专人进行结果统计,评价检测结果与留样(模拟)样品之间的符合率<sup>[44]</sup>。

##### 3.1.2 免疫学定性项目检测

分析性能参数一般包括符合率、精密度(重复性)、检出限、临界值、抗干扰能力等。实验室应根据不同检验项目的预期用途,选择对检验结果质量影响

较大的参数进行验证<sup>[45]</sup>。

##### 3.1.3 免疫学定量项目检测

分析性能参数一般包括:正确度、线性区间和可报告范围验证,精密度验证和抗干扰能力<sup>[46]</sup>。实验室应根据不同检验项目的预期用途,选择对检验结果质量有重要影响的参数进行验证。

##### 3.1.4 分子检测项目

定性检测验证内容包括:符合率验证、检测限验证和交叉反应。定量检测的验证内容包括:正确度、精密度、线性区间和定量限验证<sup>[47]</sup>。

#### 3.2 质量控制

##### 3.2.1 室内质控

(1)形态学检查:使用中的染色剂,至少每周(若检测频率小于每周 1 次,则实验当日)用已知阳性和阴性(适用时)的质控菌株检测<sup>[6]</sup>。(2)免疫学检测。定性项目:每检测日或分析批,应使用弱阳性和阴性质控物进行质控<sup>[45]</sup>。定量项目:根据检测项目和质量规

范要求,设计室内质量控制方法,质控规则应能检出随机误差和系统误差<sup>[46]</sup>。(3)分子检测项目。应制定室内质量控制程序。质量控制程序中应有针对核酸检测防污染的具体措施。实验室应充分利用所建立的质量指标对分子检测质量进行监控。质控规则应确保试验的稳定性和检验结果的可靠性<sup>[47]</sup>。

### 3.2.2 能力验证

实验室应按要求参加相应的能力验证/室间质评。应对“不满意”和“不合格”的能力验证/室间质评结果进行分析并采取纠正和预防措施。对没有开展能力验证/室间质评的项目,应至少每 6 个月与其他实验室(或其他试验方法)进行 1 次性能比对评估试验<sup>[6]</sup>。

### 3.2.3 人员比对

实验室应制定人员比对的程序,规定由多个人员进行的手工检验项目比对的方法和判断标准,至少包括显微镜检查、培养结果判读、结果报告,定期(至少每 6 个月 1 次)进行检验人员的结果比对、考核并记录<sup>[6]</sup>。

## 4 安全要求

根据《人间传染的病原微生物目录》生物安全级别要求,结合本共识涉及的检测内容和方法,建议在保证安全的前提下,对含有未知真菌活菌样本进行涂片、显微镜直接镜检、免疫学实验、PCR 核酸提取等初步检测活动时,需要在二级或以上生物安全防护级别的实验室进行。血清学、免疫学实验及不需要人工提取核酸的分子生物学检测可在一级或以上生物安全防护级别的实验室进行。一旦病原菌初步明确,应按病原微生物的危害类别将其转移至相应生物安全级别的实验室<sup>[48-49]</sup>。

**执笔人(排名次序不分先后):**班立芳(河南省传染病医院)、楚亚菲(河南省人民医院)、陈仁德[河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)]、陈向阳[河南中医药大学第五临床医学院(郑州人民医院)]、郭长城(黄河水利委员会黄河中心医院)、韩云港(河南省胸科医院)、荆楠(河南省人民医院)、李妹(河南省沁阳市人民医院)、马冰(河南省人民医院)、马琼(河南省人民医院)、孟高攀(河南省第二人民医院)、阙蔚鹏(河南省儿童医院郑州儿童医院)、秦辉(郑州颐和医院)、孙英(河南省直第三人民医院)、宋俐君(郑州市中医院)、秦淑红(郑州大学第三附属医院)、王山梅(河南省人民医院)、王健(平煤神马医疗集团总医院)、许俊红(河南省人民医院)、张江峰(河南省人民医院)

**专家组成员(排名次序不分先后):**曹珂(郑州市中医院)、陈红军(安阳市肿瘤医院)、杜伟鹏(南阳市中心医院)、郭利敏(新乡市中心医院)、郭庆合(新乡医学院第三附属医院)、高远(永城市人民医院)、郭瑞娟(濮阳市人民医院)、胡冬梅(驻马店市第一人民医院)、何全利(焦作市人民医院)、江涛(河南科技大学第一附属医院)、贾向红(许昌市人民医院)、焦淑静(商丘市第三人民医院)、孔俊峰(平顶山市第一人民医院)、李轶(河南

省人民医院)、李爱华(河南省胸科医院)、廖琳(郑州市第一人民医院)、郎少磊(三门峡市中心医院)、李德保(焦作市人民医院)、李军民(焦作市人民医院)、孙声桃(河南省人民医院)、单志萃(河南正清源生物科技有限公司)、武晓英(平顶山市第二人民医院)、徐豪(郑州大学第三附属医院)、肖伟强(河南省肿瘤医院)、杨坤(黄河水利委员会黄河中心医院)、闫忠(周口市中医院)、严敏(信阳市罗山县人民医院)、朱立强(郑州大学第二附属医院)、周志敏(许昌市人民医院)、郑业煊(郑州安图生物工程股份有限公司)

**利益冲突:**所有作者声明不存在利益冲突。

### 参考文献

- [1] FANG W J, WU J Q, CHENG M R, et al. Diagnosis of invasive fungal infections: challenges and recent developments [J]. J Biomed Sci, 2023, 30(1): 42.
- [2] 张丽, 康梅, 陈中举, 等. 我国霉菌感染流行病学分析: 多中心回顾性研究[J]. 协和医学杂志, 2023, 14(3): 559 - 565.
- [3] SILVA J T, RUIZ - CAMPS I, AGUADO J M. Invasive fungal infection over the last 30 years [J]. Rev Iberoam Micol, 2021, 38(2): 47 - 51.
- [4] CARROLL KC, PFALLER M A. 临床微生物学手册 [M]. 12 版. 王辉, 马筱玲, 钱渊, 等译. 北京: 中华医学电子音像出版社, 2021: 1925 - 2060.
- [5] 卢洪洲, 徐和平, 冯长海. 医学真菌检验与图解 [M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2023: 16.
- [6] 杨启文, 倪语星, 林丽开, 等. 临床微生物实验室真菌检测能力建设基本要求专家共识 [J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(7): 514 - 528.
- [7] DONNELLY J P, CHEN S C, KAUFFMAN C A, et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the european organization for research and treatment of cancer and the mycoses study group education and research consortium [J]. Clin Infect Dis, 2020, 71(6): 13671376.
- [8] PATTERSON T F, DONNELLY J P. New concepts in diagnostics for invasive mycoses: non - culture - based methodologies [J]. J Fungi (Basel), 2019, 5(1): 9.
- [9] 中国医药教育协会真菌病专业委员会, 国家皮肤与免疫疾病临床医学研究中心(北京大学第一医院), 国家血液疾病临床医学研究中心(北京大学人民医院). 侵袭性真菌病实验室诊断方法临床应用专家共识 [J]. 中华内科杂志, 2022, 61(2): 134141.
- [10] 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物学分会, 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学和免疫学分会微生物学组. 侵袭性真菌病真菌学检查指南 [J]. 中华检验医学杂志, 2023, 46(6): 541 - 557.
- [11] BOONSARNGSUK V, NIYOMPATTAMA A, TEOSIRIMONGKOL C, et al. False - positive serum and bronchoalveolar lavage *Aspergillus* galactomannan assays caused by different antibiotics [J]. Scand J Infect Dis, 2010, 42(6/7): 461 - 468.
- [12] HUNG Y H, LAI H H, LIN H C, et al. Investigating factors of false - positive results of *Aspergillus* galactomannan assay: a case - control study in intensive care units [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 747280.
- [13] 牛雨溪, 刘博华, 杨苏乔, 等. 半乳糖甘露聚糖试验诊断侵袭性曲霉病假阳性原因研究进展 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43(10): 862866.
- [14] RICHARDSON M, PAGE I. Role of serological tests in the diagnosis of mold infections [J]. Curr Fungal Infect Rep, 2018, 12(3): 127 - 136.
- [15] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 变应性支气管肺曲霉病诊治

- 专家共识[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(34): 2650-2656.
- [16] YAO Y K, ZHOU H, YANG Q, et al. Serum aspergillus fumigatus specific IgG antibody decreases after antifungal treatment in chronic pulmonary aspergillosis patients[J]. Clin Respir J, 2018, 12(4): 1772-1774.
- [17] LAMOTH F, AKAN H, ANDES D, et al. Assessment of the role of 1,3- $\beta$ -D-glucan testing for the diagnosis of invasive fungal infections in adults[J]. Clin Infect Dis, 2021, 72(Suppl 2): S102-S108.
- [18] MURRI R, CAMICI M, POSTERARO B, et al. Performance evaluation of the (1,3)- $\beta$ -D-glucan detection assay in non-intensive care unit adult patients[J]. Infect Drug Resist, 2019, 12: 19-24.
- [19] PITARCH A, NOMBELA C, GIL C. Diagnosis of invasive candidiasis: from gold standard methods to promising leading-edge technologies[J]. Curr Top Med Chem, 2018, 18(16): 1375-1392.
- [20] LASS-FLÖRL C, SAMARDZIC E, KNOLL M. Serology anno 2021 - fungal infections: from invasive to chronic[J]. Clin Microbiol Infect, 2021, 27(9): 1230-1241.
- [21] LEÓN C, OSTROSKY-ZEICHNER L, SCHUSTER M. What's new in the clinical and diagnostic management of invasive candidiasis in critically ill patients[J]. Intensive Care Med, 2014, 40(6): 808-819.
- [22] WANG K F, LUO Y P, ZHANG W, et al. Diagnostic value of *Candida* mannan antigen and anti-mannan IgG and IgM antibodies for *Candida* infection[J]. Mycoses, 2020, 63(2): 181-188.
- [23] 浙江省医学会呼吸病学分会. 肺隐球菌病诊治浙江省专家共识[J]. 中华临床感染病杂志, 2017, 10(5): 321-326.
- [24] ZHAO Y B, YE L X, ZHAO F J, et al. *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health[J]. Infect Dis Poverty, 2023, 12(1): 20.
- [25] GREENE G, LAWRENCE D S, JORDAN A, et al. Cryptococcal meningitis: a review of cryptococcal antigen screening programs in Africa[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2021, 19(2): 233-244.
- [26] WILLIAMS D A, KIIZA T, KWIZERA R, et al. Evaluation of fingerstick cryptococcal antigen lateral flow assay in HIV-infected persons: a diagnostic accuracy study[J]. Clin Infect Dis, 2015, 61(3): 464-467.
- [27] LONGLEY N, JARVIS J N, MEINTJES G, et al. Cryptococcal antigen screening in patients initiating ART in South Africa: a prospective cohort study[J]. Clin Infect Dis, 2016, 62(5): 581-587.
- [28] RUTAKINGIRWA M K, KIIZA T K, RHEIN J. "False negative" CSF cryptococcal antigen with clinical meningitis: case reports and review of literature[J]. Med Mycol Case Rep, 2020, 29: 29-31.
- [29] WHITE P L, BRETAGNE S, CALIENDO A M, et al. *Aspergillus* polymerase chain reaction - an update on technical recommendations, clinical applications, and justification for inclusion in the second revision of the EORTC/MSGERC definitions of invasive fungal disease[J]. Clin Infect Dis, 2021, 72(Suppl 2): S95-S101.
- [30] BOCH T, SPIESS B, HEINZ W, et al. *Aspergillus* specific nested PCR from the site of infection is superior to testing concurrent blood samples in immunocompromised patients with suspected invasive aspergillosis[J]. Mycoses, 2019, 62(11): 1035-1042.
- [31] 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): 3731-3734.
- [32] HENG S C, MORRISSEY O, CHEN S C, et al. Utility of bronchoalveolar lavage fluid galactomannan alone or in combination with PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis in adult hematology patients: a systematic review and meta-analysis[J]. Crit Rev Microbiol, 2015, 41(1): 124-134.
- [33] 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.
- [34] BASSETTI M, AZOULAY E, KULLBERG B J, et al. EORTC/MSGERC definitions of invasive fungal diseases: summary of activities of the Intensive Care Unit Working Group[J]. Clin Infect Dis, 2021, 72(2): S121-S127.
- [35] NIETO M, ROBLES J C, CAUSSE M, et al. Polymerase chain reaction versus blood culture to detect *Candida* species in high-risk patients with suspected invasive candidiasis: the MICAFEM study[J]. Infect Dis Ther, 2019, 8(3): 429-444.
- [36] FELIX G N, DE FREITAS V L T, DA SILVA JUNIOR A R, et al. Performance of a real-time PCR assay for the detection of five *Candida* species in blood samples from ICU patients at risk of candidemia[J]. J Fungi (Basel), 2023, 9(6): 635.
- [37] MILLON L, CAILLOT D, BERCEANU A, et al. Evaluation of serum mucorales polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of mucormycoses: the MODIMUCOR prospective trial[J]. Clin Infect Dis, 2022, 75(5): 777-785.
- [38] CHEN Y Q, FENG W, YE K, et al. Application of metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis of pulmonary infectious pathogens from bronchoalveolar lavage samples[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 541092.
- [39] ZHENG Y, QIU X J, WANG T, et al. The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in lower respiratory tract infection[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 694756.
- [40] 上海市医学会分子诊断专科分会, 上海市医学会检验医学专科分会, 上海市微生物学会临床微生物学专业委员会, 等. 病原体核酸即时检测质量管理要求专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(11): 1021-1028.
- [41] 中华预防医学会医院感染控制分会. 临床微生物标本采集和送检指南[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(20): 3192-3200.
- [42] 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物学分会, 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学和免疫学分会微生物学组. 侵袭性真菌病真菌学检查指南[J]. 中华检验医学杂志, 2023, 46(6): 541-557.
- [43] 王辉. 《临床微生物学检验》一书出版[J]. 中华检验医学杂志, 2015(9): 641.
- [44] 王晓娟, 马筱玲, 吴文娟. 《WS/T 807—2022 临床微生物培养鉴定和药敏检测系统的性能验证》解读[J]. 中华检验医学杂志, 2023, 46(6): 532-536.
- [45] 中国合格评定国家认可委员会. 临床免疫学定性检验程序性能验证指南: CNAS-GI038[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019: 2-9.
- [46] 国家卫生健康委员会通告(国卫通[2022]12号)[J]. 中华人民共和国国家卫生健康委员会公报, 2022(11): 1.
- [47] 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室分子诊断领域认可指南: CNAS-GI050[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021: 2-8.
- [48] 国家卫生健康委关于印发人间传染的病原微生物目录的通知[J]. 中华人民共和国国家卫生健康委员会公报, 2023(8): 16-46.
- [49] 国家卫生计生委发布《临床实验室生物安全指南》等两项推荐性卫生行业标准[J]. 中国医药生物技术, 2014, 9(4): 277.