

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.07.008

曲霉菌半乳甘露聚糖单克隆抗体的制备及初步应用*

黄茜 杨萍萍 张强 廖雨晴 李晓彤[△]

(厦门大学生命科学学院 福建 厦门 361102)

摘要 目的:制备抗曲霉菌半乳甘露聚糖的单克隆抗体,并基于获得的抗体建立用于快速准确检测曲霉菌感染的双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA),以期可用于侵袭性曲霉菌病的临床诊断。**方法:**提取曲霉菌半乳甘露聚糖后免疫 BALB/c 小鼠,筛选与制备抗曲霉菌半乳甘露聚糖的单克隆抗体,通过间接 ELISA 法与 Western Blot 方法开展单克隆抗体检测性能分析,使用获得的单克隆抗体建立双抗体夹心 ELISA 方法,并初步应用于曲霉菌感染血清检测。**结果:**获得抗曲霉菌半乳甘露聚糖单克隆抗体 5 株,均可特异性识别曲霉菌半乳甘露聚糖,其中以性能最佳的 3C9 抗体和辣根过氧化物酶标记的 3C9 抗体配对为基础,建立了双抗体夹心 ELISA 方法,通过初步评价确定该方法可应用于临床侵袭性曲霉菌病血清检测,并且该方法与现有商品化试剂盒相比检测背景值较低,可更有效区分曲霉菌感染阴阳性血清。**结论:**本研究筛选获得针对曲霉菌半乳甘露聚糖的特异性单克隆抗体,以该抗体为基础建立双抗体夹心 ELISA 方法具有潜在转化应用前景,可为侵袭性曲霉菌病的临床诊断提供支持。

关键词:曲霉菌;半乳甘露聚糖;酶联免疫吸附法;单克隆抗体

中图分类号:R-33;R379;R379.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)07-1241-05

Preparation of Monoclonal Antibodies Against the Aspergillus Galactomannan and Its Preliminary Application*

HUANG Xi, YANG Ping-ping, ZHANG Qiang, LIAO Yu-qing, LI Xiao-tong[△]

(College of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian, 361102, China)

ABSTRACT Objective: To prepare monoclonal antibodies (mAbs) against Aspergillus galactomannan (GM) and establish a rapid and accurate double-antibody sandwich ELISA for Aspergillus detection and for possible application in the diagnosis of invasive aspergillosis (IA). **Methods:** BALB/c mice were immunized with extracted GM from Aspergillus. MAbs against GM were screened and prepared. Indirect ELISA and Western Blot were used to evaluate the obtained mAbs. Then, a double-antibody sandwich ELISA for Aspergillus detection was established and preliminarily applied to detect Aspergillus infection using sera from patients. **Results:** Five strains of anti-GM monoclonal antibodies were obtained, all of which could specifically recognize the GM of Aspergillus. In this study, based on the best-performing mAb pairs of 3C9 and Horseradish Peroxidase (HRP)-conjugated 3C9, a double-antibody sandwich ELISA was established. Through preliminary evaluation, it was confirmed that this method could be applied to the clinical serum detection of IA. Compared with the existing commercial kits, this method could more effectively distinguish the negative and positive sera of Aspergillus infection with a much lower background. **Conclusion:** Specific mAbs against Aspergillus GM were obtained in this study and a double-antibody sandwich ELISA for Aspergillus detection was established, which has the potential for translation and could provide support for IA diagnosis.

Key words: Aspergillus; Galactomannan; ELISA; Monoclonal antibodies

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R379; R379.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)07-1241-05

前言

近年来,随着大量抗生素的应用、骨髓器官移植的广泛开展,以及艾滋病的流行,深部真菌感染的发病率与死亡率正在逐年增加^[1,2]。侵袭性曲霉菌感染(Invasive aspergillosis, IA)是一种最为常见且预后极为严重的深部真菌感染,主要发生在急性

白血病、骨髓干细胞移植、实体器官移植和恶性肿瘤化疗后的患者,已成为免疫抑制或免疫缺陷患者死亡的主要原因之一^[3-7]。侵袭性曲霉菌感染导致的疾病中以肺曲霉病最常见,其致病菌--烟曲霉菌的分生孢子被吸入后,可在肺泡生长并入侵肺实质,随后可通过血液循环侵入靶器官和深层组织^[8,9]。抗曲霉菌药在早期应用才能达到良好的治疗效果,因此针对侵袭性曲霉菌感

* 基金项目:福建省教育厅中青年教师教育科研项目(JAT170013)

作者简介:黄茜(1989-),女,硕士,主要从事单克隆抗体和诊断试剂研究, E-mail: huangxi@xmu.edu.cn

[△] 通讯作者:李晓彤(1958-),女,博士,教授,硕士生导师,主要从事抗体研发、诊断试剂研究、肿瘤治疗研究,

E-mail: xtli@xmu.edu.cn, 电话: 15860733869

(收稿日期:2019-08-28 接受日期:2019-09-23)

染的早期诊断对患者获得及时治疗,从而减少侵袭性曲霉菌感染导致死亡至关重要^[10-12]。

目前针对曲霉菌相关疾病的诊断方法大都不理想,主要存在以下问题:(1)曲霉菌很难从血液或者痰标本中分离培养,且培养阳性结果对诊断的价值不大;(2)曲霉菌相关疾病的组织病理学证据难以获得,其影像学表现较为滞后^[13,14];(3)PCR法虽被广泛应用于临床诊断曲霉菌病,但部分检测环节及检测性能仍存争议,尚未形成统一标准,还无法评价PCR法作为早期诊断曲霉菌相关疾病的价值,等等。

近年研究发现,曲霉菌半乳甘露聚糖(Galactomannan, GM)抗原的检测对侵袭性曲霉菌病的早期诊断有较为重要的价值^[15-18]。GM是表达在大部分曲霉菌细胞壁表面的一种多糖成分,在侵袭性曲霉菌感染过程中会释放到血液、脑脊液、支气管肺泡灌洗液和尿液中^[19]。目前对曲霉菌GM抗原检测采用简单、快速和高通量的一步法夹心酶免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)。然而,当前市场上仅有一种曲霉菌GM抗原检测的ELISA试剂盒,且该试剂盒存在假阳性高、背景值高的问题,制约了其在临床上的广泛应用^[20,21]。由此可见,对曲霉菌GM抗原检测的ELISA方法仍存在较大的优化空间。因此,本研究通过杂交瘤技术制备抗曲霉菌GM抗原的特异性单克隆抗体,探索建立高灵敏度、高特异性的曲霉菌ELISA检测方法,以期对曲霉菌的临床检测提供更好支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 弗式佐剂、次黄嘌呤、胸腺嘧啶、氨基嘌呤、HRP标记的GAM IgG抗体、小鼠抗体分型试剂盒购自美国Sigma公司,超敏ECL化学发光试剂盒购自新赛美生物科技有限公司,RPMI1640培养基及胎牛血清(FBS)购自Thermo Fisher Scientific公司,Platelia™曲霉菌抗原检测试剂盒购自Bio-Rad公司,其它常用化学试剂购自西陇化工股份有限公司。

1.1.2 细胞株和实验动物 小鼠骨髓瘤细胞SP2/0由本实验室从ATCC上购买所得,6-8周龄的BALB/c小鼠F1代小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司。

1.1.3 黑曲霉菌(Aspergillus niger) 由厦门大学生命科学学院教学中心赠送。

1.1.4 临床血清 临床血清来自福建省肿瘤医院,包括经组织标本培养或组织病理鉴定确诊的侵袭性肺曲霉菌病人血清4份及正常人血清43份。

1.2 方法

1.2.1 曲霉菌GM提取 将曲霉菌以划线的方式在LB培养基平板上培养24小时后,把曲霉菌接种到1640培养基中,放置于摇床上37℃培养7天后离心取培养上清,用50%乙醇沉淀上清中的GM,用生理盐水进行吹溶后得到曲霉菌GM,分装于4℃保存。

1.2.2 单克隆抗体制备 将曲霉菌GM与等体积的弗氏完全佐剂(首次免疫使用)或不完全佐剂混合成均匀的乳化状态后,以皮下注射的方式和100 μg/只的剂量注射到BALB/c小鼠四肢,初次免疫后再进行两次加强免疫,每次免疫前对小鼠进行眼内眦采血。最后在脾免一次后取小鼠脾脏进行融合。采用有

限稀释法对杂交瘤细胞进行克隆化,取杂交瘤细胞培养上用ELISA间接法筛选与筛选原反应强的单克隆。经过至少3轮克隆化筛选后,获得阳性单克隆杂交瘤细胞。将获得的单克隆杂交瘤细胞扩大培养后,注射至F1小鼠腹腔,收集腹水后通过Protein-A亲和层析柱纯化得到单克隆抗体。

1.2.3 阳性杂交瘤细胞株筛选的ELISA间接法检测 将GM用CB缓冲液(pH 9.6)进行稀释,使其浓度为100 μg/mL,100 μL/孔包被在96孔微孔板上,4℃过夜。用1×PBST缓冲液洗板1次后,每孔加入200 μL含有5% BSA的PBS缓冲液37℃孵育2小时。用1×PBST缓冲液洗板1次,检测时每孔加入50 μL杂交瘤细胞上清,37℃孵育1小时。用1×PBST缓冲液洗5次后,每孔加入100 μL用含有1% BSA的PBS缓冲液稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记GAM IgG抗体(1:5000)37℃孵育1小时。用1×PBST洗5次后,每孔加入100 μL显色液37℃孵育15分钟,加入50 μL终止液后在酶标仪上读OD450 nm值。

1.2.4 酶联免疫夹心法检测 将纯化好的抗GM单克隆抗体用PB 7.4缓冲液进行稀释后(0.5、100、200、400或800 ng/孔)包被于8K辐照板上,4℃过夜。用1×PBST缓冲液洗板1次后,每孔加入200 μL含有5% BSA的PBS缓冲液37℃孵育2小时。用1×PBST缓冲液洗板1次,检测时每孔加入50 μL稀释的GM(100 μg/mL)或者临床血清或生理盐水,37℃孵育1小时。用1×PBST缓冲液洗5次后,每孔加入100 μL用含有1% BSA的PBS缓冲液稀释的HRP标记抗GM单克隆抗体(1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000或1:16000)37℃孵育1小时。用1×PBST洗5次后,每孔加入100 μL显色液37℃孵育15分钟,加入50 μL终止液后在酶标仪上读OD450 nm值。

1.2.5 Western Blot检测 以提取的曲霉菌GM为样品,以生理盐水为阴性对照。经10% SDS-PAGE,通过湿电转膜仪使胶上的蛋白转移硝酸纤维素膜上,使用5%脱脂牛奶4℃封闭过夜,以曲霉菌GM单克隆抗体3C9(稀释至1 μg/mL)为一抗37℃孵育1小时,用TBST缓冲液洗涤5次后,以HRP标记的GAM IgG抗体(按1:5000稀释)为二抗37℃孵育30分钟,用TBST洗涤5次后使用超敏ECL化学发光试剂盒显色并且拍照保存。

2 结果

2.1 抗曲霉菌GM单克隆抗体的制备、纯化与鉴定

本研究提取曲霉菌GM作为抗原免疫BALB/c小鼠,通过杂交瘤技术和间接ELISA法筛选获得5株可分泌针对曲霉菌GM的单克隆抗体。ELISA检测结果如图1A所示,所有单抗对阴性对照(生理盐水)无反应,但与提取的GM都有较好的特异性反应,且抗体效价达10⁵到10⁶。使用小鼠单克隆抗体分型试剂盒对5株单抗进行亚型鉴定,结果发现1B7、8D3和11G4为IgG2a亚型,3C9和9D1为IgG3亚型。随后,挑选反应活性最好的单抗3C9进行Western Blot检测,结果如图1B所示,单抗3C9与阴性对照(生理盐水)无反应,与提取GM有较好的特异性反应,且形成大小为40-100 kDa的多个条带,这可能体现了提取GM存在的不同聚体形式。

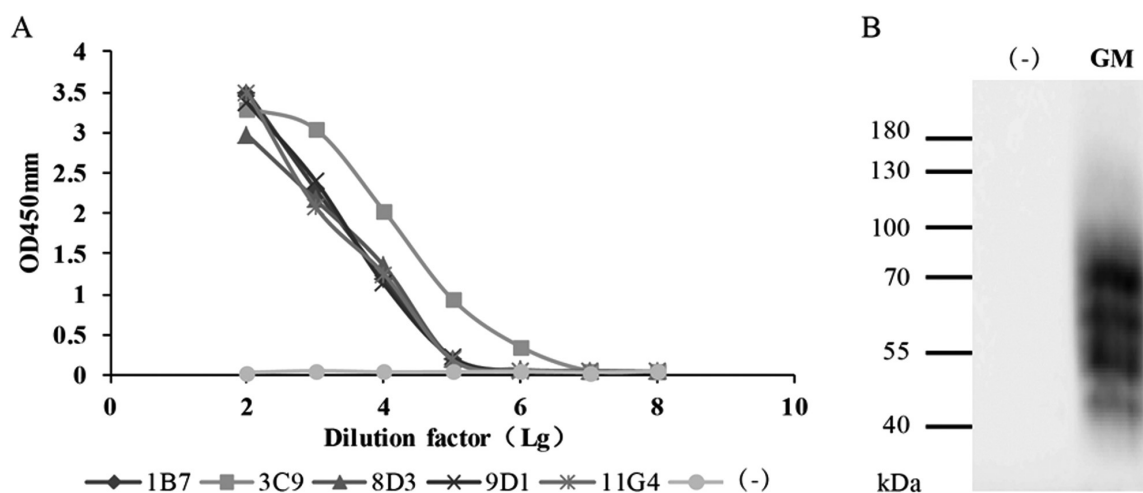


图1 抗 GM 单克隆抗体评价

Fig.1 Evaluation of anti-GM mAbs

Note: (A) Evaluation of anti-GM mAbs by ELISA. (B) Evaluation of anti-GM mAb 3C9 by Western Blot. (-), negative control. GM, galactomannan.

2.2 基于抗曲霉菌 GM 单克隆抗体建立针对曲霉菌的 ELISA 检测方法

本研究基于获得的抗曲霉菌 GM 单克隆抗体,尝试建立针对曲霉菌的快速特异 ELISA 检测方法。首先,将纯化好的抗 GM 单抗进行 HRP 标记作为检测抗体,并将未标记的单抗作为包被抗体,用提取的曲霉菌 GM 作为检测抗原,通过交叉配对的方式进行不同抗体配对的检测评价。初步条件如下:检测抗体 1/1000 稀释,包被抗体 400 ng/每孔,检测 100 ng/孔的 GM。由于曲霉菌 GM 是一种多聚抗原,包含甘露糖骨干与半乳糖旁基的多糖,其表面可能存在多个相同的识别表位,因此本研究也评估了同一单抗组成的抗体配对的 GM 检测性能。结果如图 2A 所示,同一单抗 3C9 组成的抗体配对 3C9 + 3C9-HRP 对 GM 检测性能相对较好(P/N 高),可用于后续实验。

随后,通过梯度稀释的方式摸索了包被抗体和检测抗体的最佳使用浓度,以阴性孔(生理盐水)平均读值 4 倍以上(Cutoff 值)为 GM 检测阳性的判断标准,同样检测 100 ng/孔的 GM。结果如图 2B 和 2C 所示,最终确定了针对曲霉菌的 ELISA 检测方法(GM-ELISA)条件如下:400 ng 每孔的包被抗体浓度,37℃ 包被 1 小时;检测样品时使用的检测抗体为 1/4000 稀释,37℃ 反应 30 分钟;最后加入 TMB 显色液显色 15 分钟,检测 OD450 值。在此条件下,抗体配对 3C9 + 3C9-HRP 本底在 0.1 以下,检测 100 ng/孔的 GM 时 P/N 比可达 30。本研究进一步将 GM 从 2 ng 每孔做 2 倍梯度稀释至 0.0312 ng 每孔,稀释样品用于评估基于抗体配对 3C9 + 3C9-HRP 建立的 GM-ELISA 方法的检测下限。结果如图 2D 所示,该方法最低可检测到 0.125 ng 每孔的 GM,浓度在 0.125 ng 每孔以下的 GM 样品其 OD450 读值均低于 Cutoff 值(图中虚线)。

2.3 将 GM-ELISA 应用于曲霉菌临床血清检测

为初步验证建立的 GM-ELISA 检测方法用于临床检测曲霉菌感染的有效性,本研究收集到 47 份临床血清,其中正常人阴性血清 43 份,经组织标本培养与组织学鉴定确诊为侵袭性肺曲霉菌病病人的阳性血清 4 份,同批使用建立的 GM-ELISA 方法(图 3A)与 Biorad Platelia[®]曲霉菌抗原检测试剂盒(图 3B)进行检测比较。结果如图 3 所示,两种方法检测 43 份正常人血

清检测结果均为阴性,4 份曲霉菌感染病人血清检测结果均为阳性,其中检测提取 GM(1 μg 每孔)作为阳性对照,检测生理盐水作为阴性对照。

背景值高是目前曲霉菌 GM 检测的商品化试剂盒假阳性高的重要因素之一。商品化试剂盒通常使用一份标准样本检测读值后用于判定阴阳性,在本研究中该标准样本读值为 1.0085,而阴性血清或 PBS 样本的大部分读值均在 0.8~1,十分接近 Cutoff 读值,阴阳性较难分开。值得注意的是,本研究建立的 GM-ELISA 方法对阴性样本的检测 OD₄₅₀ 读值均在 0.1 以下,相较于商品化试剂盒背景值低很多,与阳性血清检测读值(0.5 以上)差别较大,容易区分阴阳性。综合以上试验结果,本研究基于抗 GM 单抗配对 3C9 + 3C9-HRP 建立的 ELISA 方法具有用于临床曲霉菌感染检测的可行性和潜力。

3 讨论

侵袭性曲霉病主要感染免疫低下人群,是危害最大且预后最差的深部真菌感染之一。该病主要通过空气传播,是曲霉菌孢子通过人呼吸道侵入体内,随后进入血液循环蔓延全身、侵犯并损伤人体重要组织器官后导致,通常病情较重,病死率高。近年来,随着免疫缺陷病患者的增加,侵袭性曲霉菌病的发病率和死亡率不断上升,侵袭性曲霉菌病的早期诊断与治疗越来越受到关注,对于曲霉菌快速高效检测方法建立的需求也越来越迫切。

侵袭性曲霉菌病诊断的“金标准”是组织标本内的病原菌培养或组织病理学,但是由于病人通常是免疫受损且伴有各类血细胞减少,组织活检可能存在风险,因此该项检查在临床上通常不能及时实施或者不能对该病做出及时识别。近年来研究发现,病人血清内曲霉菌 GM 抗原含量的检测对侵袭性曲霉菌病的早期诊断具有重要参考价值^[6]。通过 ELISA 方法对病人血清内曲霉菌 GM 抗原进行检测十分快速简便,目前临床应用较多,但市场上现有 ELISA 试剂盒的准确性不尽人意,主要存在假阳性高、背景值高等问题,因此该方法仍存在较大的优化空间。

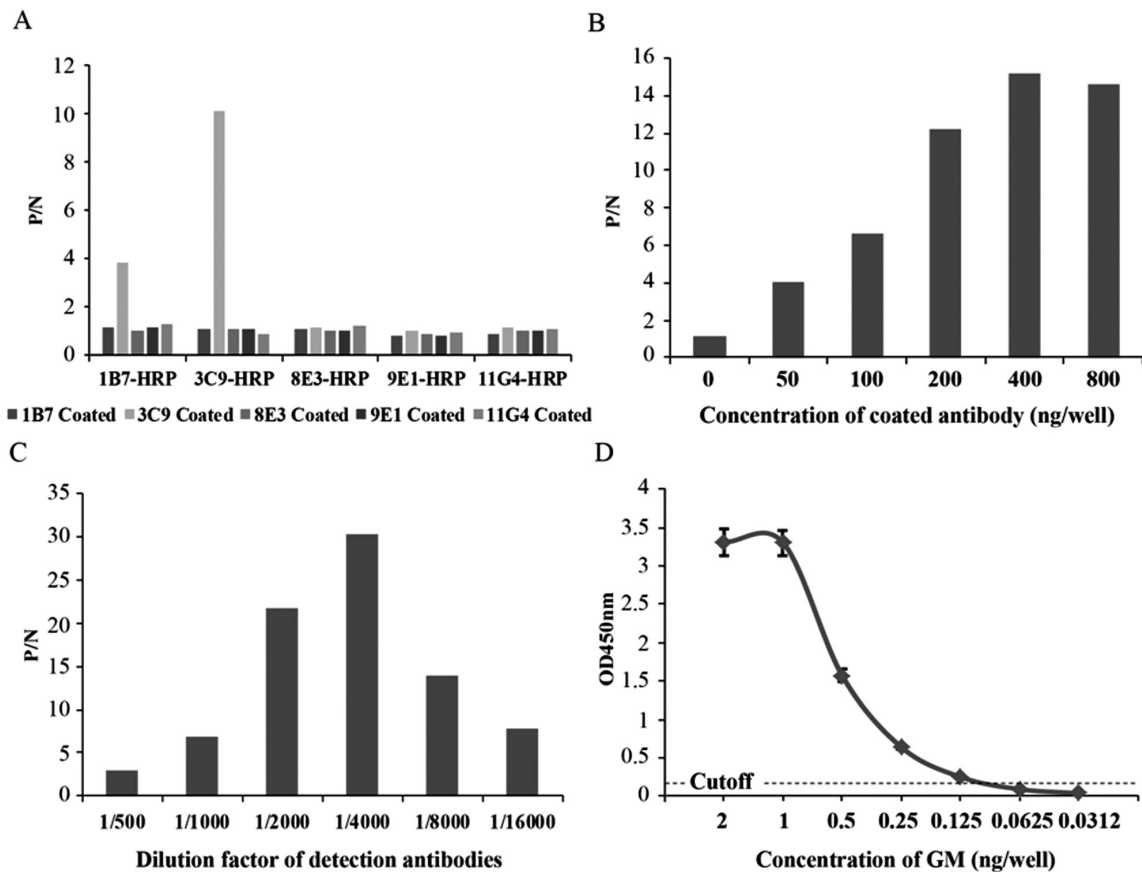


图2 基于抗 GM 单克隆抗体建立针对曲霉菌的 ELISA 检测方法

Fig.2 Development of an ELISA for Aspergillus detection using anti-GM mAbs

Note: (A) Selection of antibody pairs for the establishment of sandwich ELISA. (B) Selection of the concentration of coating antibodies. (C) Selection of the concentration of detecting antibodies. (D) Evaluation of the detection limit of the established GM-ELISA.

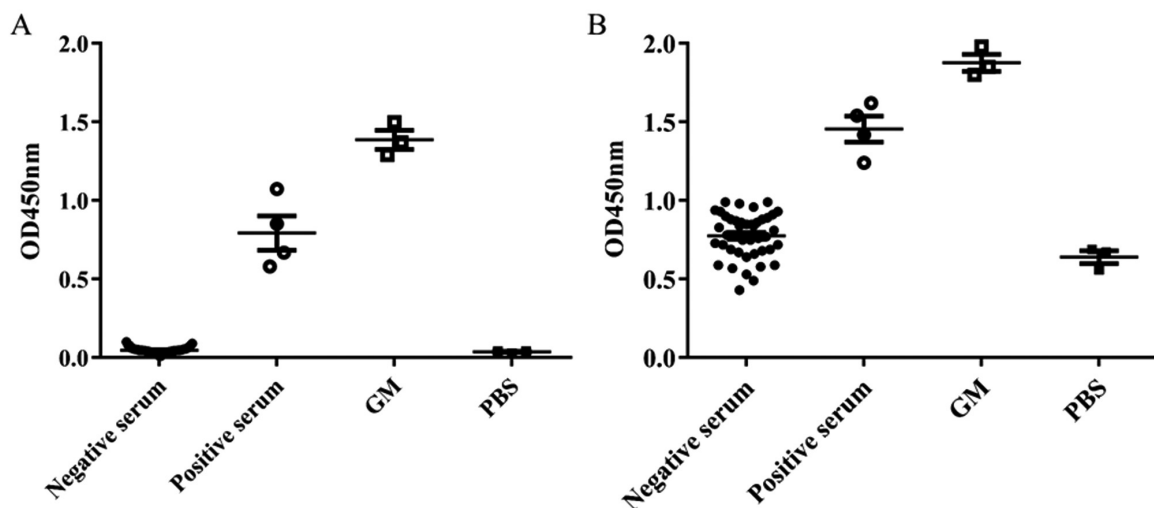


图3 建立的 GM-ELISA 方法可区分曲霉菌临床阳性和阴性血清

Fig.3 Clinical positive and negative sera of Aspergillus can be distinguished by the established GM-ELISA

Note: (A) GM-ELISA in this study. (B) BioRad Platelia™ Aspergillus EIA.

本研究尝试基于曲霉菌细胞壁 GM 单克隆筛选与 ELISA 方法,建立高灵敏度、高特异性的曲霉菌 GM 的检测试剂。首先,本研究制备了曲霉菌 GM 的单克隆抗体,筛选出 5 株抗曲霉菌 GM 的单抗并且进行配对,结果获得具有较好反应性与特异性的抗体配对 3C9+3C9-HRP,最终通过优化抗体包被浓度,检测抗体浓度和稀释液等建立针对曲霉菌的 GM-ELISA 检测方法。该方法背景值较低(0.1 以下),且对 GM 检测的 P/N 比较

高(100 ng/孔可达 30),最低检测下限达到 0.125 ng 每孔。为了进一步评价该试剂的检测性能,我们收集并检测了 47 份临床血清,其中 43 份正常人阴性血清,4 份确诊侵袭性曲霉菌病人的阳性血清,检测结果显示该试剂可有效区分侵袭性曲霉菌病人的临床阳性血清和阴性血清,P/N 比为 16.7,并且该试剂与商品化试剂相比在背景值上具有显著优势,有助于提高判定曲霉菌感染阴阳性的效率。由于本研究收集到的确诊侵袭性曲

霉菌病的样本量少,该方法临床应用的检测性能有待于扩大样本例数后进一步评价。

综上所述,本研究筛选获得一株性能较好的抗曲霉菌 GM 单克隆抗体 3C9,基于该抗体建立双抗体夹心的 GM-ELISA 检测试剂。该试剂具有较好的反应性与特异性,能够有效应用于检测临床血清中的曲霉菌 GM 抗原含量,可为侵袭性曲霉菌感染的临床诊断提供支持。

参考文献(References)

- [1] Koehler P, Hamprecht A, Bader O, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis and azole resistance in patients with acute leukaemia: the SEPIA Study[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2017, 49(2): 218-223
- [2] Heldt S, Prattes J, Eigl S, et al. Diagnosis of invasive aspergillosis in hematological malignancy patients: Performance of cytokines, Asp LFD, and Aspergillus PCR in same day blood and bronchoalveolar lavage samples[J]. *J Infect*, 2018, 77(3): 235-241
- [3] Mellinghoff SC, Panse J, Alakel N, et al. Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: 2017 update of the recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society for Haematology and Medical Oncology (DGHO)[J]. *Ann Hematol*, 2018, 97(2): 197-207
- [4] Reischies FM, Raggam RB, 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
- [5] Eigl S, Prattes J, Lackner M, et al. Multicenter evaluation of a lateral-flow device test for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in ICU patients[J]. *Crit Care*, 2015, 19: 178
- [6] Maschmeyer G, Ruhnke M. Update on antifungal treatment of invasive Candida and Aspergillus infections [J]. *Mycoses*, 2004, 47 (7): 263-276
- [7] Marr KA, Carter RA, Boeckh M, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors[J]. *Blood*, 2002, 100(13): 4358-4366
- [8] 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
- [9] Orasch T, Prattes J, Faserl K, et al. Bronchoalveolar lavage triacetyle fusarinine C (TAFC) determination for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies[J]. *J Infect*, 2017, 75(4): 370-373
- [10] Maertens J, Theunissen K, Verbeken E, et al. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients[J]. *Br J Haematol*, 2004, 126(6): 852-860
- [11] 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 semiprospective multicenter study [J]. *Transplantation*, 2014, 98(8): 898-902
- [12] 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
- [13] Boch T, Buchheidt D, Spiess B, et al. Direct comparison of galactomannan performance in concurrent serum and bronchoalveolar lavage samples in immunocompromised patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis[J]. *Mycoses*, 2016, 59(2): 80-85
- [14] Hoenigl M, Prattes J, Spiess B, et al. Performance of galactomannan, beta-d-glucan, Aspergillus lateral-flow device, conventional culture, and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52 (6): 2039-2045
- [15] Young AY, Leiva Juarez MM, Evans SE. Fungal Pneumonia in Patients with Hematologic Malignancy and Hematopoietic Stem Cell Transplantation[J]. *Clin Chest Med*, 2017, 38(3): 479-491
- [16] Buchheidt D, Reinwald M, Hoenigl M, et al. The evolving landscape of new diagnostic tests for invasive aspergillosis in hematology patients: strengths and weaknesses[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2017, 30(6): 539-544
- [17] Hsiao HH, Tsai HJ, Liu YC, et al. Invasive fungal infections in patients with acute leukemia [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2006, 22 (5): 217-222
- [18] Jung J, Kim MY, Chong YP, et al. Clinical characteristics, radiologic findings, risk factors and outcomes of serum galactomannan-negative invasive pulmonary aspergillosis [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2018, 51(6): 802-809
- [19] Shao PL, Huang LM, Hsueh PR. Invasive fungal infection--laboratory diagnosis and antifungal treatment [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2006, 39(3): 178-188
- [20] Verweij PE. Advances in diagnostic testing[J]. *Med Mycol*, 2005, 43 Suppl 1: S121-S124
- [21] Golyshevskaya VI, Korneev AA, Chernousova LN, et al. New microbiological Techniques in diagnosis of tuberculosis [J]. *Probl Tuberk*, 1996(6): 22-25