

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001255

NASBA-ELISA 检测曲霉菌方法的建立及在侵袭性曲霉病诊断中的应用评价

杜 丽, 夏 云

(重庆医科大学附属第一医院医学检验科, 重庆 400016)

【摘要】目的:建立基于核酸序列依赖扩增的酶联免疫(enzyme-linked immunosorbent assay of nucleic acid sequence-based amplification, NASBA-ELISA)法用于侵袭性曲霉病(invasive aspergillosis, IA)的诊断,并评价其诊断价值。**方法:**将核酸序列依赖扩增技术(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)方法和高灵敏度的地高辛检测系统相结合,采用地高辛标记 NASBA 恒温扩增曲霉菌特异性 18sRNA 基因片段,用生物素标记的 DNA 探针在链酶亲和素包被的微孔板孔中杂交捕获地高辛标记的 NASBA 扩增产物,最后加入碱性磷酸酶标记的地高辛抗体和底物进行酶标显色,应用此法分别对梯度数量的曲霉菌孢子和其临床常见菌株进行检测以评价其灵敏度和特异度,并通过对 82 例临床标本(32 例阳性,50 例阴性)的检测分析其临床诊断效能。**结果:**将含有梯度数量的曲霉菌孢子的样本提取总 RNA 后进行 NASBA-ELISA 检测,结果表明光密度值与霉菌孢子量对数存在线性相关关系($y=0.278x+0.119$, $R^2=0.887$),该方法的灵敏度可达 1 个孢子;对照菌株(大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和新型隐球菌)和曲霉菌提取 RNA 后进行检测,结果仅曲霉菌的吸光度(absorbance, A)值大于设定的阈值(6 个随机阴性标本的平均 A 值+3 倍标准差)呈阳性;对 82 例临床标本进行 NASBA-ELISA 检测,其敏感度和特异度分别为 80.6%、80.0%,受试者工作特征曲线曲线下面积为 0.759(95%CI=0.644~0.874)。**结论:**NASBA-ELISA 方法检测曲霉菌具有敏感性高、特异性强、操作简便的特点,适合常规实验室开展,为侵袭性曲霉病的早期诊断提供了一条新方法。

【关键词】NASBA-ELISA; 侵袭性曲霉病; 曲霉菌**【中图分类号】**R331**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2016-09-05

Development and application of diagnostic NASBA- ELISA for invasive aspergillosis

Du Li, Xia Yun

(Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To develop a nucleic acid sequence-based amplification coupled ELISA method for detection of invasive aspergillosis (IA). **Methods:** In this experiment, the nucleic acid sequence-based amplification was combined to the high sensitive system of digoxigenin. The specific 18sRNA of *Aspergillus* was amplified by the isothermal digoxigenin (DIG)-labeling NASBA process, then the DIG-labeled NASBA amplicons were immobilized on streptavidin-coated microtiter plate by hybridized with a specific biotinylated DNA probe. The hybrids were colorimetrically detected by the addition of an anti-DIG antibodies linked to AIP and substrate (disodium 4-nitrophenyl phosphate). The specificity, sensibility and the clinical diagnostic efficiency of this method were evaluated by detecting the total RNA extracted from the ten-fold serially titrated *Aspergillus* spores, the RNA extracted from the comparisons and 82 blood samples (32 positive cases, 50 negative cases). **Results:** The total RNA extracted from the ten-fold serially titrated *Aspergillus* spores was detected by NASBA-ELISA. The optical density value was linearly correlated with the logarithm of the spore amount ($y=0.278x+0.119$, $R^2=0.887$), and this method could detect as little as 1 CFU aspergillums spore. The RNA extracted from the comparisons (*E. coli*, *S. aureus*, *P. Aeruginosa*, *C. albicans*, *C. neoformans*) and *Aspergillus* were detected by NASBA-ELISA. The results showed that NASBA-ELISA was highly specific for *Aspergillus* detection and did not cross-react with the non-target fungi or bacteria. The performance of NASBA-ELISA system was evaluated by detecting blood samples of 82 patients at high risk for IA. The sensitivity and specificity were 80.6% and 80.0%. The NASBA-ELISA A values were assessed by ROC analysis, area under the curve=0.755 (95%CI=0.645 to 0.865). **Conclusion:** The NASBA-ELISA method can detect *Aspergillus* sensitively and specifically, so it provides a new way for the molecular epidemiologic investigation and early diagnosis of IA.

【Key words】NASBA-ELISA; invasive aspergillosis; *Aspergillus*

作者介绍: 杜 丽, Email: 1132548582@qq.com,

研究方向: 细菌耐药机制和方法学研究。

通信作者: 夏 云, Email: xiayun12cn@aliyun.com。

基金项目: 重庆市卫生计生委科研课题资助项目(编号: 2008-2-312);

重庆市渝中区基础和前沿研究课题资助项目(编号: 20160129)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170427.1153.006.html>

(2017-04-27)

目前,尽管真菌感染在预防和治疗方面已经取得了明显的进步,但是近年来由于激素、广谱抗菌药和强效免疫抑制剂、细胞毒性药物的广泛应用,以及器官移植技术和介入治疗的发展、恶性肿瘤和获得性免疫缺陷综合征患者的增多,侵袭性曲霉病(invasive aspergillosis, IA)发生率逐年增加。此病进展快,早期诊断困难,病死率高^[1-2]。目前分子生物学方法在侵袭性曲霉病诊断中是最有应用前景的方法。核酸序列依赖扩增技术(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)是基于 PCR 发展起来的一项新型的成熟的恒温 RNA 扩增技术, 现已广泛应用于狂犬病病毒^[3]、肝炎病毒^[4]、禽流感病毒^[5]等病原体的快速检测。传统 NASBA 产物的检测多采用电泳或印迹杂交等方式检测,但其不适用于临床常规大量样品的检测。本试验在恒温扩增曲霉菌 RNA 的基础上结合寡核苷酸分子杂交和酶标显色反应,旨在建立一种能够应用于临床样本侵袭性曲霉病检测的简便、快速、标准化程度高的 NASBA-ELISA 检测技术,为早期诊断曲霉菌感染、及时预防和治疗侵袭性曲霉病提供有效技术手段。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 真菌和细菌 将烟曲霉菌株(CMCC A1a)及黑曲霉菌株(临床分离)接种于沙保罗平板,置于 28℃恒温箱中进行培养,24~48 h 后收获曲霉孢子于生理盐水中混匀,并用消毒处理过后的牛鲍计数板对孢子进行计数以备用。大肠埃希菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)接种于哥伦比亚血琼脂平板,置于 37℃恒温箱中培养 2~3 d 备用,白色念珠菌(ATCC 64548)和新型隐球菌(临床分离)接种于沙保罗平板,置于 28℃恒温箱中培养 2~3 d 备用。

1.1.2 主要试剂 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公

司。地高辛标记的 UTP(DIG-UTP)、碱性磷酸酶标记的地高辛抗体购自 Roche 公司。核糖核酸酶 H、AMV 反转录酶、RNasin 购自 Promega 公司。NTP、dNTP、T7 RNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司。链霉素和素包被的微孔板购自江苏海狸公司, pNPP 显色剂购自上海翊圣公司。

1.1.3 引物及探针 曲霉菌扩增的靶序列位于具有属特异性的 18S rRNA 保守序列区^[6],引物和探针序列(表 1)从文献中获得^[7],均由大连宝生物工程有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 核酸 RNA 的制备 细菌或真菌的总 RNA 提取均采用 Trizol 试剂,真菌抽提前用液氮研磨 2 min。提取的 RNA 存于-80℃备用。

1.2.2 NASBA 扩增体系的建立 5 μL 的 RNA 模板和 10 μL 的反应混合物[各 2 mmol/L NTP, 0.2 mmol/L DIG-UTP, 1.6 mmol/L dNTP, 40 mmol/L Tris-HCl(pH=8.5), 70 mmol/L KCl, 5 mmol/L DMSO, 12 mmol/L MgCl₂, 0.375 mol/L 山梨醇, 12 U ribonuclease inhibitor, 引物各 0.4 μmol/L]加入无酶 EP 管中混匀, 65℃加热 5 min 以去除 RNA 二级结构, 41℃冷却 5 min 后加入 5 μL 酶混合物(40 U T7 RNA 聚合酶, 2.0 μg 牛血清白蛋白, 8 U AMV 反转录酶, 0.1 U 核糖核酸酶 H)并轻轻混匀, 41℃反应 90 min, 然后于-20℃终止反应。焦碳酸二乙酯(DEPC)水配制 1%琼脂糖凝胶以及 1×TAB, 电泳仪在 H₂O₂ 中浸泡 15 min, 用 DEPC 水冲洗, 取 NASBA 产物电泳 20 min, 凝胶仪成像观察。

1.2.3 NASBA 扩增产物的 ELISA 检测 生物素标记的探针用 PBST 缓冲液(0.05% Tween-20, pH 7.2, DEPC 水配制)稀释至浓度 0.1 mmol/L, 100 μL 加入链霉素和素包被的微孔板室温轻搅 1 h, PBST 洗板 3 次, 每孔加入 10 μL 地高辛标记的 NASBA 产物(预先 95℃加热 2 min), 90 μL 杂交缓冲液(50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0, DEPC 水配制)轻摇混匀, 37℃孵育 1 h, PBST 洗板 3 次。每孔加入 100 μL 碱性磷酸酶标记的地高辛抗体(1:500)37℃孵育 30 min, PBST 洗板 5 次。每孔加入 100 μL pNPP 显色溶液, 室温避光显色 15 min, 每孔加入 50 μL 终止液终止显色, 酶标仪读取 405 nm 处的吸光度(absorbance, A)值, 阳性与阴性的临界值为 0.097, 当 A≥0.097 判为阳性, A<0.097 判为阴性。

表 1 实验所用引物和探针序列

Tab.1 Nucleotide sequences of oligonucleotide primers and probe used in this study

引物/探针	序列(5'-3')	长度(bp)	参考位置
Primers 2.1	5'-GCCGCGTAATTCCAGCTCCAATA-3'	24	Loeffler et al.(2001) ^[7]
Primers 1.2+T7	5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGG-AGCAAAGGCCTGCTTTGAACA-3'	47	Loeffler et al.(2001) ^[7]
杂交探针	Bioth-GGTCCGCCTCACCGCGAGTACTG-3'	20	Loeffler et al.(2001) ^[7]
阳性对照	5'-CAGTACTCGCGGTGAGGCGGACC-3'	20	
NASBA 产物		243	

注:标有下划线的是 T7 启动子序列

1.2.4 特异性分析 按照上述方法,以临床常见的感染病原菌标准株大肠埃希菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)、白色念珠菌(ATCC 64548)和新型隐球菌(临床分离)为对照组,对照组菌株总 RNA 提取后,分别取 5 μ L RNA 作为模板进行 NASBA-ELISA 反应,反应体系除模板外的其他成分及含量与曲霉菌标准株的反应体系相同。

1.2.5 灵敏度实验 曲霉菌接种于沙保罗平板,置于 28 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 24~48 h。接种环多次挑取曲霉菌落于生理盐水中反复混匀制成菌悬液,用消毒后的牛鲍计数板对菌悬液的孢子进行计数,调整孢子浓度为 10^6 个/mL,菌液再按 1:9 比例逐步稀释成 10^5 个/mL、 10^4 个/mL 孢子浓度。分别取上述 3 个浓度的菌悬液各 100 μ L 提取 RNA,并将 10^4 个/mL 孢子浓度菌悬液提取的 RNA 再连续稀释 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 倍。然后以提取的这 7 个梯度曲霉菌孢子的 RNA 作为模板进行 NASBA-ELISA 分析,检测能达到阳性光密度阈值的最高稀释倍数,从而推断 NASBA-ELISA 的灵敏度。以梯度曲霉菌孢子的菌液总 RNA 为模板进行 NASBA 扩增,凝胶电泳分析能出现可观察条带所对应的曲霉菌孢子,推断 NASBA 的灵敏度。

1.2.6 NASBA-ELISA 临床应用评价 以欧洲癌症研究和治疗组织/侵袭性真菌感染协作组和美国变态反应和感染病研究院真菌病研究组(EORTC/MSG)共识组 2008 年修订的定义为诊断标准^[9],收集确诊或拟诊为侵袭性曲霉病的血液样本 32 例(7 例确诊,25 例拟诊),确诊 IA 是具有组织病理学证据或者无菌部位(无菌体液)中培养出曲霉属;拟诊 IA 是从痰或支气管灌洗液中培养出曲霉,且具备 1 项主要特点(CT 检查见“晕征”或“新月征”,或实化区域内出现空洞)或 2 项次要临床特点:①下呼吸道感染症状;②胸膜摩擦音;③除外其他可能的肺部新浸润灶。并排除入院前或入院后 48 h 内发生侵袭性曲霉菌感染的患者。按照同病区、同性别、无曲霉菌定植、入院时间前后 ≤ 10 d、住院时间不少于病例组从住院到发生院内侵袭性曲霉菌感染的时间等筛选条件,随机选取同时期内没有发生医院侵袭性曲霉病感染的 50 例样本作为对照组。血清标本先进行半乳甘露聚糖实验(Galactomannan, GM)实验检测,然后所有血清标本存于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中以备用,检测时取出标本恢复室温后取 400 μ L 不需研磨直接用 Trizol 试剂提取,进行 NASBA-ELISA 检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 进行统计分析,对该方法的临床效能应用 ROC 曲线分析评价;对 A 值与曲霉菌孢子数的对数的关系进行 Pearson 相关分析和直线回归,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

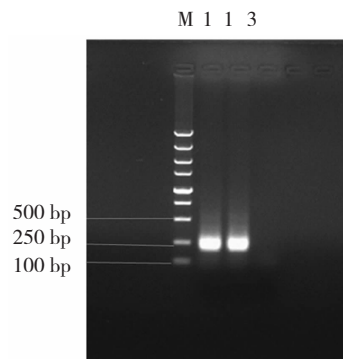
2.1 阳性判断阈值的选取

本实验以随机选取的 6 个阴性样本的平均 A 值(0.061)

+3 个标准差(0.012)^[9-10]作为判断阈值,所以以 0.097 为界值,当 $A \geq 0.097$ 判为阳性, $A < 0.097$ 判为阴性。

2.2 NASBA 扩增产物的电泳检测

NASBA 扩增产物的凝胶电泳结果表明,曲霉菌 RNA 扩增出约为 240 bp 的片段,阴性对照无特异性的扩增片段(图 1),表明 NASBA 能完成对曲霉菌 RNA 的扩增。



M:DL2000 Marker; 1:烟曲霉;2:黑曲霉;3:阴性对照

图 1 NASBA 扩增产物的电泳

Fig.1 Detection of NASBA products by 1% agarose gel electrophoresis

2.3 特异性分析

将 5 种对照菌和曲霉菌同时进行 NASBA 扩增,并将扩增产物同时进行 ELISA 和电泳检测,电泳结果表明仅曲霉菌的 RNA 扩增产物在 240 bp 处出现了目的条带,ELISA 方法仅检测到曲霉菌的结果(图 2,表 2),表明本研究所用的引物和探针具有好的特异性。

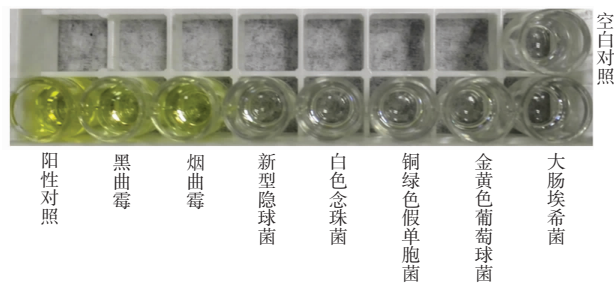


图 2 NASBA-ELISA 质控菌株显色结果

Fig.2 Results of the NASBA-ELISA for coloration of different quality control strains

表 2 NASBA-ELISA 方法的特异性分析

Tab.2 Analysis of specificity of the NASBA-ELISA DIG-detection system

菌株	OD $\pm$ 3S	结果
阳性对照	2.303 $\pm$ 0.011	+
大肠埃希菌	0.041 $\pm$ 0.002	-
金黄色葡萄球菌	0.054 $\pm$ 0.005	-
铜绿假单胞菌	0.067 $\pm$ 0.002	-
白色念珠菌	0.085 $\pm$ 0.005	-
新型隐球菌	0.069 $\pm$ 0.004	-
烟曲霉	1.465 $\pm$ 0.012	+
黑曲霉	1.303 $\pm$ 0.004	+
空白对照	0.049 $\pm$ 0.007	-

2.4 灵敏度实验

NASBA 扩增梯度稀释的曲霉孢子提取的 RNA, 经 ELISA 方法检测, 结果见表 2, 表明本方法灵敏度可达 1 个孢子, A 值与曲霉菌孢子量的对数存在线性相关关系见表 3 和图 3。

表 3 NASBA-ELISA 灵敏度分析
Tab.3 Analysis of sensitivity of the NASBA-ELISA
DIG-detection system

曲霉孢子数	A ± 3S	结果
阳性对照	2.114 ± 0.007	+
10 ⁻¹	0.087 ± 0.004	-
10 ⁰	0.132 ± 0.005	+
10 ¹	0.302 ± 0.004	+
10 ²	0.433 ± 0.005	+
10 ³	0.675 ± 0.006	+
10 ⁴	1.346 ± 0.008	+
10 ⁵	1.745 ± 0.019	+
空白对照	0.051 ± 0.007	-

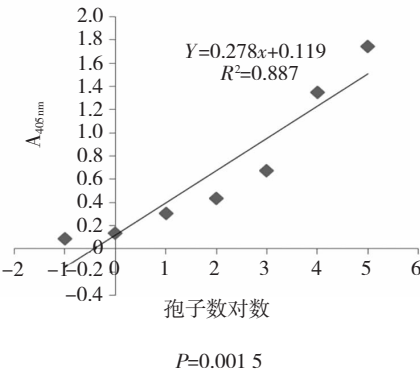


图 3 NASBA-ELISA 检测 A 值与曲霉菌孢子数的对数存在线性关系

Fig.3 Correlation between log-transformed individual measurements of Aspergillus spores and absorbance readings

2.5 NASBA-ELISA 检测的性能评价

分别用 NASBA-ELISA 和 GM 试验对收集的 82 份临床血清样本进行检测, A ≥ 0.097 判为阳性, A < 0.097 判为阴性。GM 试验的灵敏度为 58.3%, 特异度为 82.0%; NASBA-ELISA 法的灵敏度为 80.6%, 特异度为 80.0%, 见表 4。ROC 曲线下面积为 0.755 (95%CI = 0.645~0.865), 如图 4 所示。

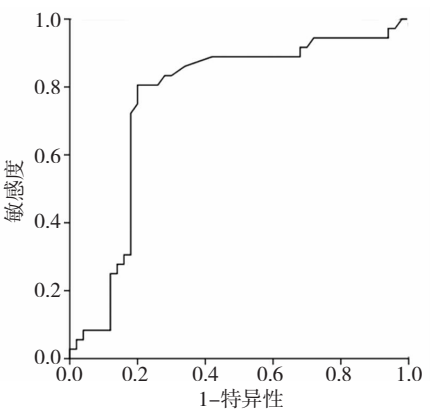


图 4 ROC 曲线下面积

Fig.4 ROC curve of the NASBA-ELISA assay

3 讨论

侵袭性曲霉病是易发生在免疫力低下人群中的一种机会性致病菌感染, 其早期诊断是成功抗真菌治疗的关键。但是此病的临床症状并不特异, 影像学检查也缺乏特异性, 目前实验室针对此病的诊断方法主要是真菌培养和血清学检查, 但培养阳性率低且耗时长, 其原因可能和体内免疫细胞的吞噬作用有关。而血清学抗原抗体检测结果差异大, 存在着假阳性和假阴性, 与该方法采集频率、时机及阳性结果评判标准等因素有关^[2]。分子生物学方法是曲霉菌感染诊断中最具有应用前景的一种方法。

本研究采用 NASBA 联合 ELISA 的检测方法, 鲜有文献报道用于曲霉菌检测。NASBA 方法是一种成熟的等温扩增技术, 其灵敏度高, 在适宜的条件下, 扩增倍数可达 10⁹, 且不易受 DNA 的污染^[11]。NASBA 看似体系复杂, 但实际操作却很简单, 只需在同一恒温体系中加入模板、引物和 3 种酶, 恒温孵育 1.5 h 即可进行有效扩增。在其后的检测过程中, NASBA 扩增产物通过生物素标记的捕获探针被特异性地固定在微孔板上, 随后加入抗体及底物显色, 其比色信号值与扩增产物浓度呈线性关系, 据此可对曲霉菌浓度进行半定量测定, 检测过程中生物

表 4 2 种检测方法阳性和阴性检出情况
Tab.4 The detecting results of the two methods

方法	阳性 (n=32)	阴性 (n=50)	灵敏度 (%)	特异性 (%)	准确度 (%)
NASBA-ELISA	26	40	81.25	80.00	80.48
GM 试验	18	41	56.25	82.00	71.95
NASBA-ELISA 和 GM	17	50	53.12	100.00	81.70
NASBA-ELISA 或 GM	27	31	84.37	62.00	70.73

素-链霉亲和素放大系统的运用增强该方法的灵敏度,且扩增所用的引物和检测所用的探针的双重作用确保了该方法的特异性。

GM 试验是 EORTC/MSG 标准所纳入的实验且近年来广泛应用于临床检验,但是 GM 试验的影响因素较多,早期和准确诊断 IA 依然存在困难。NASBA-ELISA 法将 NASBA 扩增技术与 ELISA 检测方法相结合,初步建立了侵袭性曲霉病的检测方法,其灵敏度可达 1 个孢子,且具有较高的特异性。本研究中,GM 试验敏感度为 58.3%,特异度为 82.0%,与文献报道的“GM 试验特异性尚可,灵敏度较低”相一致^[12]。而 NASBA-ELISA 法的敏感度为 80.6%,特异度为 80.0%,次于 GM 实验,因环境中存在曲霉菌,阳性标本在检测过程中可能会污染阴性标本,此外,NASBA 是一种高效扩增,轻微的污染经扩增后都会被显著放大等因素影响其特异度,使其有一定的假阳性,所以实验操作尽量在消毒过后的生物安全柜中进行,每次加样更换枪头避免交叉污染,并尽量缩短实验时间。每次试验设立空白对照组,进一步规范实验操作。

结果表明 NASBA-ELISA 在检测临床样本上具有显著高于 GM 试验的灵敏度和与 GM 试验差不多的特异度。在 36 例阳性标本的监测中,有 1 例 GM 阳性而 NASBA-ELISA 阴性,一方面,有文献报道 GM 实验并不对曲霉菌属特异,它与青霉菌属、镰刀菌属、链格孢属等存在交叉反应抗原^[13];另一方面,曲霉菌游离核酸的存在一般是宿主免疫反应或菌丝自我分解的结果,而半乳糖聚糖一般是在曲霉菌快速增值时释放入血,这 2 种靶标的释放时间不同^[14]。综上所述,可能会出现 GM 阳性而 NASBA-ELISA 阴性,因此 2 种方法在特定情况下联用会取得更好的效果。另外,本试验建立的对侵袭性曲霉病 RNA 的检测只需要一个恒温水浴箱及一台常规酶标仪。NASBA-ELISA 克服了以往核酸检测产品成本高、仪器设备要求高、难以普及等缺点^[15],非常适用于基层单位和一些发展相对落后的国家开展,对侵袭性曲霉病的检测具有实际意义。

参 考 文 献

[1] Barton RC. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis:from diagnosis to prediction of outcome[J]. *Scientifica*,2013,2013:459405.

- [2] Chandrasekar P. Diagnostic challenges and recent advances in the early management of invasive fungal infections[J]. *Eur J Haematol*, 2010,84(4):281-290.
- [3] Wacharapluesadee S,Hemachudha T. Nucleic-acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies[J]. *Lancet*,2001,358(9285):892-893.
- [4] Damen M,Sillekens P,Cuyppers HT,et al. Characterization of the quantitative HCV NASBA assay[J]. *J Virol Methods*,1999,82(1):45-54.
- [5] Lau LT,Banks J,Aherne R,et al. Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2004,313(2):336-342.
- [6] Perlin DS,Zhao Y. Molecular diagnostic platforms for detecting *Aspergillus*[J]. *Med Mycol*,2009,47(s1):223-232.
- [7] Loeffler J,Hebart H,Cox P,et al. Nucleic acid sequence-based amplification of *Aspergillus* RNA in blood samples[J]. *J Clin Microbiol*,2001,39(4):1626-1629.
- [8] De Pauw B,Walsh TJ,Donnelly JP,et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European organization for research and treatment of cancer/invasive fungal infections cooperative group and the national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (EORTC/MSG) consensus group[J]. *Clin Infect Dis*,2008,46(12):1813-1821.
- [9] Gill P,Ramezani R,Amiri MV,et al. Enzyme-linked immunosorbent assay of nucleic acid sequence-based amplification for molecular detection of *M. tuberculosis*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2006,347(4):1151-1157.
- [10] Jean J,Blais B,Darveau A,et al. Rapid detection of human rotavirus using colorimetric nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)-enzyme-linked immunosorbent assay in sewage treatment effluent[J]. *FEMS Microbiol Lett*,2002,210(1):143-147.
- [11] Monis PT,Giglio S. Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification[J]. *Infect Genet Evol*,2006,6(1):2-12.
- [12] Wang L,He Y,Xia Y,et al. Retrospective comparison of nucleic acid sequence-based amplification,real-time PCR,and galactomannan test for diagnosis of invasive aspergillosis[J]. *J Mol Diagn*,2014,16(5):584-590.
- [13] Mikulska M,Furfaro E,Del Bono V,et al. Galactomannan testing might be useful for early diagnosis of fusariosis[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*,2012,72(4):367-369.
- [14] Mennink-Kersten MA,Ruegebrink D,Wasei N,et al. In vitro release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens,1,3-beta-D-glucan,and DNA,surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis[J]. *J Clin Microbiol*,2006,44(5):1711-1718.
- [15] 尹锐,薛健,孙亚娟. 建立用于检测 HIV-1 的基于核酸序列扩增的酶联免疫吸附测定法[J]. *国际检验医学杂志*,2014,35(3):263-266.

(责任编辑:冉明会)