

## 葡聚糖结合蛋白的原核表达及检测深部真菌感染的应用

朱李茹<sup>1</sup>, 黄友明<sup>2</sup>, 章宏祥<sup>2</sup>, 周发友<sup>2</sup>, 唐晓磊<sup>2\*</sup>

(1. 湖北文理学院附属医院 襄阳市中心医院 医学检验部, 湖北 襄阳 441021;  
2. 皖南医学院第二附属医院 转化医学中心, 安徽 芜湖 241000)

**摘要:**目的 验证葡聚糖特异性的结合蛋白用于检测深部真菌感染 (IFI) 患者血清中 (1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖的应用价值。方法 通过构建美洲鲎葡聚糖结合蛋白 (GBP) 252 位氨基酸至 668 位氨基酸活性区域表达质粒——pET30a-GBP252-668, 表达并纯化获得 GBP252-668 重组蛋白。随后通过棋盘法构建双 GBP252-668 夹心法, 并以此检测 IFI 患者血清中 (1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖。同时与 G 试验 (G-Test) 进行检测性能的比对。结果 成功纯化获得分子质量约为 46 ku 的 GBP252-668 重组蛋白, 并确定最佳包被浓度和检测浓度分别为 8 和 16 g/L, 以此构建了 GBP252-668 夹心法。对 48 名深部真菌感染患者和 48 名健康人血清进行检测, 根据受试者工作特征曲线 (ROC) 可得其灵敏度为 91.67%, 特异度为 89.58%。其灵敏度与 G-Test 相当, 特异性高于同批次 G-Test (79.17%)。结论 本研究构建的双 GBP 夹心法是一种极具潜力检测侵袭性真菌的方法, 其灵敏度与 G-Test 相当, 特异性高于同批次 G-Test。

**关键词:** 深部真菌感染; 葡聚糖结合蛋白; 夹心法; 临床应用

中图分类号: Q93 文献标志码: A

## Prokaryotic expression of glucans binding protein and application for detecting invasive fungal infection

ZHU Li-ru<sup>1</sup>, HUANG You-ming<sup>2</sup>, ZHANG Hong-xiang<sup>2</sup>, ZHOU Fa-you<sup>2</sup>, TANG Xiao-lei<sup>2\*</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Xiangyang Central Hospital, the Affiliated Hospital of Hubei College of Arts and Sciences, Xiangyang 441021; 2. Centre for Translational Medicine, the Second Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241000, China)

**Abstract: Objective** To explore the potential application of glucans binding protein (GBP) in the detection of soluble glucans from serum sampled from patients with invasive fungal infection (IFI). **Methods** The prokaryotic plasmid pET30a-GBP252-668 coding for 252 to 668 amino acid in GBP as an active domain of GBP of *Limulus polyphemus* was constructed. The recombinant GBP252-668 was expressed and purified. Then a double GBP252-668 sandwich method was developed to detect (1,3)- $\beta$ -D-glucans in the serum of patients with IFI. Meanwhile, the results were compared with G-test. **Results** Recombinant GBP252-668 (molecular weight is about 46 ku) was obtained and the double GBP252-668 sandwich method was established and optimized via chessboard method, the concentrations of GBP252-668 were 8 and 16 g/L for coating and detection respectively. The serum sampled from 48 patients with IFI and from 48 healthy donors were examined and results were analysed. The sensitivity and

收稿日期: 2020-07-27 修回日期: 2022-04-11

基金项目: 国家自然科学基金 (81601806)

\* 通信作者 (corresponding author): 278471655@qq.com

specificity of double GBP252-668 sandwich method were 91.67% and 89.58% respectively and the sensitivity was non-inferior to G-test, and specificity of double GBP252-668 sandwich method was even higher than that of G-test (79.17%). **Conclusions** The GBP252-668 sandwich method is a potential detection method for IFI diagnosis. The method is non-inferior to G-test and its specificity is even higher than G-test. It is expected to be a new commercially available kit for IFI detection.

**Key words:** invasive fungal infection (IFI); glucans binding protein; sandwich method; clinical application

内源性和外源性的真菌侵袭并突破了机体的皮肤黏膜屏障,从而导致了深部脏器的感染统称为侵袭性真菌感染 (invasive fungal infection, IFI),其发生概率呈上升趋势<sup>[1-2]</sup>。其主要原因大致为危险因素的增加和患者免疫力的低下,如肿瘤化疗患者、人类免疫缺陷病毒感染群体、先天性免疫功能不全者等。抗生素的不规范使用也大大增加了侵袭性真菌感染的概率,中枢神经系统的真菌感染尤为凶险<sup>[3-4]</sup>,且其诊断较为困难<sup>[5]</sup>。

临床通常以临床症状结合影像学、实验室检查为手段对其进行鉴别。最早实验室 IFI 检查手段,如真菌培养、涂片查找真菌病原体以及通过血清学实验查找;在 2009 年首次报道了 PCR 技术检测真菌的实验性研究<sup>[6]</sup>。但迄今真菌病原体的检出周期及检出率均不能满足临床的需求;此外,血清相关抗体的检查并不能够完全反映机体届时的感染状态。因此非培养的快速诊断实验室检测技术对 IFI 诊断更有意义。针对临床真菌类型,其标志物主要分为两类:酵母型真菌感染标志物[如:抗甘露聚糖抗体、抗酵母菌芽管抗体、核酸检测及(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖检测]和曲霉菌感染标志物[如:半乳甘露聚糖、曲霉菌流式检测、曲霉菌核酸检测及(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖检测]。因此,对真菌特异性抗原的检测临床主要以 G 试验为主<sup>[7]</sup>。然而饮食、药物、医疗操作以及标本质量均会对 G-Test 法检测结果产生较大的影响<sup>[8]</sup>。

鉴于以上所述,本研究通过基因克隆手段获得美洲鲎来源的葡聚糖结合蛋白 (glucans binding protein, GBP) 的葡聚糖结合活性片段,并以其为(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖特异性配基,从而实现对临床体液标本中(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖的定量<sup>[9]</sup>。旨在能够通过免疫学手段,克服其他外界因素对(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖检测的影响,从而完成 IFI 辅助诊断。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象和材料

1.1.1 研究对象:筛选皖南医学院第二附属医院 2017 年 2 月至 2019 年 10 月期间 IFI 患者和健康体检人员各 48 名。清晨空腹用促凝管抽全血 4 mL,3 500 r/min 离心 15 min 收获血清,冷冻于-80 °C 冻存备用。侵袭性真菌感染患者纳入标准:1)近期有放疗、激素类药物应用、侵入性治疗史、免疫抑制剂应用史,且伴有高热、寒战等显著感染症状;2)真菌培养和/或涂片呈阳性;3)G 试验阳性 4)白介素 6 (IL-6) 或降钙素原 (procalcitonin, PCT) 至少 1 项阳性。符合上述任意 3 项者,临床确诊为侵袭性真菌感染<sup>[10]</sup>。本研究纳入 48 例 IFI 成年患者(男/女=15/9、年龄分布为 29~73 岁),其中 36 例来源于呼吸系统患者,9 例来源于肿瘤放疗患者;3 例来源于烧伤患者。

1.1.2 试剂:pET30a-GBP252-668 质粒合成于上海生物工程公司;大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株由本实验室保存;(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖 (Elicityl 公司);抗组氨酸标签单克隆抗体(北京中杉金桥生物公司);辣根过氧化物酶标记试剂盒、无蛋白封闭液、TMB 显色液和终止液(济南泰天和生物公司);Ni-agarose 纯化柱(QIAGEN 公司);十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒和卡那霉素(kanamycin, Kan)(北京索莱宝科技有限公司);蛋白分子质量 marker 和 DNA 梯度 marker[赛默飞科技(中国)有限公司];苯甲基磺酰氟(PMSF)和蛋白酶抑制剂 cocktail,异丙基- $\beta$ -d-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactoside, IPTG)(阿拉丁生化科技股份有限公司);其余化学试剂(国药化工集团公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 GBP252-668 表达质粒的鉴定: 根据质粒信息, 使用 *Ned* I 和 *Hind* III 双限制性快速内切酶对 pET30a-GBP252-668 酶切进行鉴定, 总反应体积 20 mL, 体系如下: pET30a-GBP252-668 质粒 10 mL, *Ned* I 和 *Hind* III 限制性内切酶各 1 mL, 10×缓冲液 2 mL, dd H<sub>2</sub>O 6 mL; 于 37 °C 水浴 10 min, 95 °C 5 min 加热终止反应, 行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。同时将 pET30a-GBP252-668 质粒行测序鉴定。

1.2.2 GBP252-668 蛋白的表达及纯化: 将表达质粒转入大肠杆菌 BL21, 42 °C 水浴 90 s 热冲击, 通过卡那霉素(kanamycin, Kan)抗性 LB 固体培养基筛选并挑取阳性单克隆接种于液体 LB 培养基 5 h 后, 加入 IPTG 浓度 0.8 mmol/L, 25 °C 诱导过夜; 10 000×g, 离心 15 min 获得菌体, 预冷无菌 PBS 洗涤菌体 2 次, 离心收集菌体。-80 °C 冻融 2~3 次, 加入溶菌酶至终浓度 10 mg/mL, 4 °C 过夜, 超声裂菌 10 min。4 °C 10 000×g 离心 30 min 收集上清, 行 SDS-PAGE 分离后考马斯亮兰染色鉴定。将裂解的上清与 Ni-NAT 纯化柱置于 4 °C 混匀器上连续混匀 2 h, 期间加入苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 和蛋白酶抑制剂 Cocktail。结合后的 Ni-NAT 纯化柱依次分别使用咪唑缓冲液(含咪唑浓度 20、30、50、80、200 mmol/L) 进行洗涤、洗脱。洗脱液再次经 SDS-PAGE 分离后行考马斯亮兰染色鉴定。

1.2.3 GBP 双夹心法的体系构建: 将获得的高纯度 GBP252-668 蛋白精确定量后行辣根过氧化物酶标记。以不同浓度的 GBP 包被和不同浓度的 GBP-HRP 进行检测。以含 10% DMSO 的 PBS 溶液为阴性对照; 将 (1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖用含 10% 二甲基亚砷磷酸盐缓冲液稀释至 200 ng/L 作为阳性对照。将测得的包被浓度(coating concentration, CC) 和检测浓度(detection concentration, DC) 构建的 GBP252-668 双夹心法用于人血清基质的检测, 即以健康人血清作为阴性标本, 以加入终浓度 200 ng/L (1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖的健康人血清作为阳性标本, 作 6 个复孔, 验证本实验所建立的方法学的检测效能。

1.2.4 两种方法临床检测效能比对: 将 96 份人血清标本分别行 GBP252-668 双夹心法检测和 G-Test 检测。GBP252-668 双夹心法同时设置 5 个浓度梯

度: 0、50、100、200 和 400 ng/L, 作标准曲线。并对双夹心法与 G-Test 法测得的 (1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖结果使用 ROC 曲线分析其检测效能。

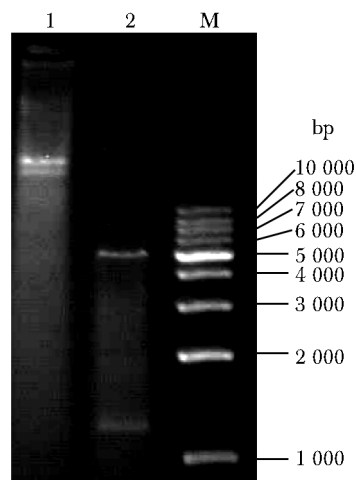
## 1.3 统计学分析

本研究数据均使用 SPSS15.0 软件进行统计分析。计数资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 两组间两两比较使用 *t* 检验, 两组间构成比比较使用卡方检验。

## 2 结果

### 2.1 GBP 表达质粒的鉴定

重组质粒 pET30a-GBP252-668 双酶切产物, 两条条带分别依次位于 1 000 bp 与 2 000 bp 之间以及 5 000 bp 与 6 000 bp 之间, 与插入目的基因大小(1 251 bp) 和 pET30a 载体片段(5 422 bp) 大小相符, 见图 1。测序结果与 Genbank (编号为: NM\_001314167.1) 比对完全一致, 无错配、突变。



1. plasmid pET30a-GBP252-668; 2. plasmid pET30a-GBP252-668 was digested by restriction enzyme *Ned* I and *Hind* III; M. DNA marker

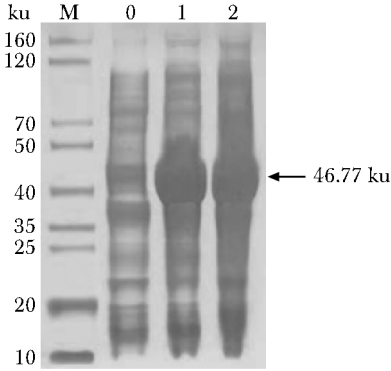
图 1 GBP 重组表达质粒 pET30a-GBP252-668 的双酶切鉴定

Fig 1 Identification of recombinant plasmid pET30a-GBP252-668 using restriction enzyme digestion

### 2.2 重组 GBP252-668 蛋白的表达及纯化

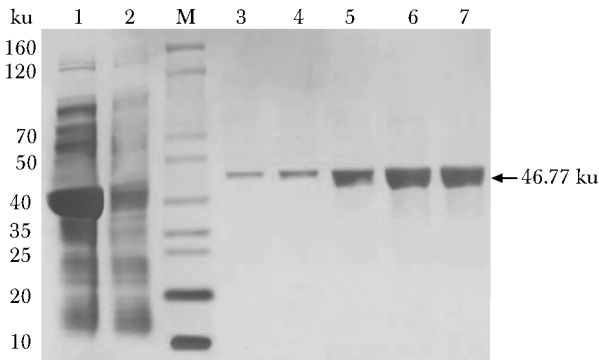
经 IPTG 诱导表达, 在分子质量 40 ku 与 50 ku 之间有一条显著高表达蛋白条带, 与预测重组目的蛋白分子质量 46 774 (约 46.77 ku) 相符(图 2); 经 Ni-agarose 纯化, 获得了纯度较高的重组 GBP 蛋白(图 3); 经由抗-His 标签单克隆抗体检测, 在 40 ku

与 50 ku 之间有条带(图 4)。



M. protein marker; 0. the *E. coli* BL21 containing recombinant plasmid pET30a-GBP252-668 was induced without IPTG; 1. the *E. coli* BL21 containing recombinant plasmid pET30a-GBP252-668 was induced with IPTG at 25 °C for 16 hours; 2. the *E. coli* BL21 containing recombinant plasmid pET30a-GBP252-668 was induced with IPTG at 37 °C for 16 hours; arrow indicated the recombinant target protein

图 2 SDS-PAGE 分析重组 GBP252-668 蛋白的表达  
Fig 2 Analysis of recombinant GBP252-668 protein expression by SDS-PAGE



M. protein marker; 1. the supernatant of lysis bacteria with IPTG-induced at 25 °C for 16 hours; 2. the residual from lysis bacteria with IPTG-induced was affinity by Ni-agarose; 3, 4, 5, 6 and 7. the supernatant of Ni-agarose were washed with different concentrations of imidazole buffer in turn, 20, 30, 50, 80, and 200 mmol/L; arrow indicated the recombinant target protein

图 3 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分析纯化的重组 GBP252-668 蛋白

Fig 3 Analysis of purified recombinant GBP252-668 protein by SDS-PAGE

### 2.3 GBP 双夹心法体系的构建

棋盘法显示,其最佳包被 GBP 浓度和 HRP 标

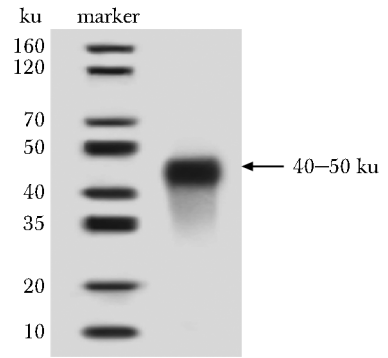


图 4 免疫印迹法分析纯化的重组 GBP252-668 蛋白  
Fig 4 Analysis of purified recombinant GBP252-668 protein by Western blot

记的 GBP 工作液分别为 0.8 g/L 和 1.6 g/L(表 1);该方法对以人血清作为基质的阴性标本和阳性标本进行检测,数据显示其阳性标本与阴性标本吸光度值(absorbance, A)比值约为 7,能够显著区分阴性与阳性(图 5)。

### 2.4 两种方法的临床检测效能比对

通过制定标准曲线拟合算法,对待测标本中的(1,3)-β-D-葡聚糖定量分析(图 6);纳入 48 名 IFI 患者和 48 名健康人作为待测对象(表 2);两种方法检测结果使用 ROC 曲线进行拟合,算得 GBP 双夹心法其灵敏度(sensitivity)和特异度(specificity)分别为 91.67%(95% CI: 80.02% ~ 97.68%)和 89.58%(95% CI: 77.34% ~ 96.53%);G 试验的敏感性和特异性分别为 91.67%(95% CI: 80.02% ~ 97.68%)和 79.17%(95% CI: 65.01% ~ 89.53%);GBP 双夹心法 ROC 曲线面积为 0.9282(95% CI: 0.8679 ~ 0.9884);G 试验的 ROC 曲线面积为 0.9128(95% CI: 0.8548 ~ 0.9695)(图 7)。

### 3 讨论

近年来,临床深部真菌感染日益严重,真菌培养、涂片是 IFI 的实验诊断金标准,但由于周期较长且标本的获取不易或容易污染,因此以(1,3)-β-D-葡聚糖为标志物的 G-Test 目前应用更为广泛<sup>[11-13]</sup>。众所周知,(1,3)-β-D-葡聚糖是绝大多数真菌细胞壁的主要骨架成分(新型隐球菌属、毛口菌属除外),随着真菌的分裂生长及机体吞噬细胞的吞噬消化,其骨架成分被释放入血,对外周血中(1,3)-β-D-葡聚糖检测可以作为深部真菌感染的辅助诊断



表 1 棋盘法确立双 GBP 夹心法的包被和检测试剂工作浓度

Table 1 Concentrations of GBP for coating and detection were established by chessboard method

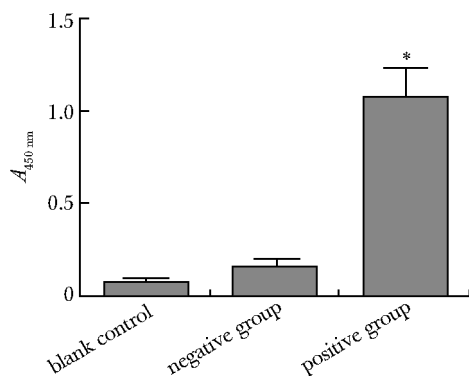
CC/(mg/L)	DC/(mg/L) (negative group)					DC/(mg/L) (positive group)				
	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
0.1	0.087	0.102	0.116	0.122	0.146	0.289	0.391	0.466	0.583	0.636
0.2	0.107	0.125	0.131	0.148	0.182	0.339	0.447	0.529	0.613	0.738
0.4	0.133	0.154	0.161	0.189	0.205	0.395	0.501	0.627	0.706	0.892
0.8	0.169	0.181	0.196	0.209	0.216	0.413	0.613	0.736	0.866	1.094
1.6	0.205	0.213	0.227	0.235	0.285	0.484	0.705	0.843	1.003	1.246

CC. stand for coating concentration of GBP252-668; DC. represent concentration of HRP-GBP252-668 for detection; the two numbers with bold and underline from positive group and negative group indicated the optimum match for coating and detection

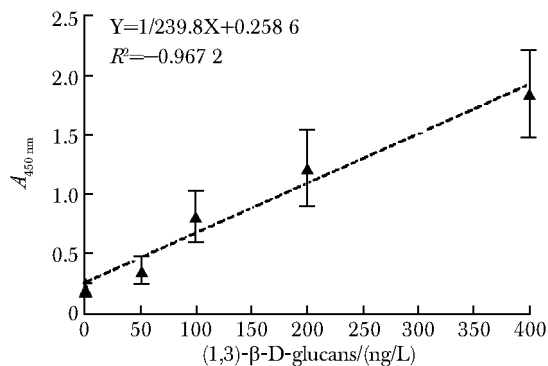
表 2 纳入研究对象的 96 名人员的基本信息比较

Table 2 Comparison of basic information from 96 donors in this research ( $\bar{x}\pm s$ )

items	healthy donor ( $n=48$ )	IFI patients ( $n=48$ )	$t, \chi^2/P$
gender (male/female)	9/7	15/9	0.156 3, 0.692 6
age/year	42.9±19.3	45.1±18.6	0.568 6, 0.571
BMI	27.9±8.1	25.6±7.3	1.461, 0.147 3
distributions			
department of respiratory medicine	-	36	-
department of oncology	-	9	-
department of burn	-	3	-
double sandwich method			
(1,3)- $\beta$ -D-Glucans/(ng/L)	24.4±10.1	135.8±62.3	12.23, <0.001
G-test	29.5±10.3	159.4±71.6	12.44, <0.001



\* $P < 0.01$  compared with blank control

图 5 构建的 GBP 双夹心法对血清基质中 (1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖的分析Fig 5 Analysis of (1,3)- $\beta$ -D-glucans in serum matrix by GBP sandwich method ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )图 6 GBP 双夹心法测定血清 (1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖标准曲线Fig 6 Stander curve of (1,3)- $\beta$ -D-glucans in serum using GBP sandwich method ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

指标。目前 G-Test 法通过动态浊度的变化推算 (1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖含量。而这一级联催化过程以及待测标本的质量严重影响检测结果。鉴于

G-Test检测手段的不足,本研究通过克隆表达 (1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖的特异性配基——GBP252-668 蛋白,利用该配基与靶标 (1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖的特异性识别与结合能力进行血清学检测,以评估机体侵袭性真菌感染状况。葡聚糖结合蛋白(GBP)

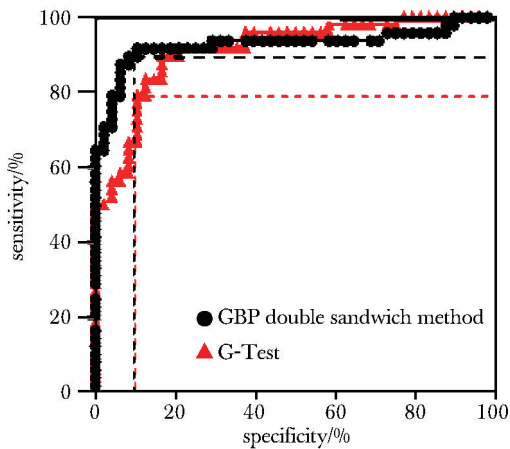


图7 两种方法对96例血清(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖检测效能的ROC曲线

Fig 7 ROC of two methods for (1,3)- $\beta$ -D-glucans detection efficiency ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=96$ )

为一类能够特异性结合葡聚糖的蛋白的统称。有研究表明不同物种来源的GBP能够高效识别并结合不同结构的葡聚糖<sup>[14]</sup>。在我们前期的预实验中发现,美洲鲎的GBP较之其他物种的GBP显示出较高的结合力。分析美洲鲎来源的GBP mRNA编码668个氨基酸肽链,其包含3个区域:第1位氨基酸到第20号氨基酸为信号肽;第27位氨基酸到第253号氨基酸为葡聚糖水解酶活性片段;第252位氨基酸到第668号氨基酸为葡聚糖活性结合片段。因此本研究纯化获得了重组GBP252-668蛋白并构建双GBP夹心法检测系统,其具有高检测灵敏度、宽线性范围等特点。

本研究使用该方法和G-Test法对临床血清标

本进行检测的性能比对,结果显示两种方法的灵敏度较为一致,而夹心法特异度高于临床现行的G-Test法。分析可能原因如下<sup>[8]</sup>:1)原理:夹心法的特异性优于级联催化法;2)血清标本的质量对夹心法影响较小;3)特定结构的靶标物质使配基法检测更为特异;4)本次探索的夹心法操作步骤简单,极大减少了操作过程中的误差。

(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖作为目前深部真菌感染公认的标志物,其在临床确诊前提前5~10 d检测出阳性<sup>[15-16]</sup>,且当病情恶化为严重脓毒症时,这一过程中该标志物的水平会持续升高。这一现象提示了对(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖的动态监测,或可用于监测临床深部真菌感染的治疗效果。而本次研究所入选研究对象均为严重深部真菌感染的患者,其病程长短不一,因此本次无法精确评估该系统预测真菌感染的价值。本方法检测的入选研究对象(IFI患者和健康体检者),其灵敏度和特异度分别为91.67% (95% CI: 80.02%~97.68%) 和89.58% (95% CI: 77.34%~96.53%), ROC曲线面积为0.9282 (95% CI: 0.8679~0.9884)。特异度高于本次检测的G-Test法。同比国外学者报道的G-Test法,均有所增高<sup>[17]</sup>。

综上所述,本研究初步实现了通过分子克隆技术模拟美洲鲎体内天然存在的特异性葡聚糖识别配基,并验证该重组配基具有识别、结合(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖的能力,并应用于临床标本检测。本次实验所构建检测方法,有望开发为一种新型的侵袭性真菌感染的检测试剂盒,进而为临床IFI鉴别诊断提供数据支持。

## 参考文献:

- [1] Enoch DA, Yang H, Aliyu SH, *et al.* The changing epidemiology of Invasive fungal infections [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1508:17-65.
- [2] Scriven JE, Tenforde MW, Levitz SM, *et al.* Modulating host immune responses to fight invasive fungal infections [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 40: 95-103.
- [3] 李云会, 黎奇, 白劲松, 等. HIV/AIDS患者侵袭性真菌感染状况及药敏研究[J]. *皮肤病与性病*, 2018, 40: 168-171.
- [4] 程卫, 魏俊吉, 王任直, 等. 中枢神经系统真菌感染诊断治疗进展[J]. *基础医学与临床*, 2012, 32:358-361.
- [5] 刘晨瑞, 李亚萍, 冯丹丹, 等. 终末期肝病合并真菌感染诊治的热点与难点[J]. *世界华人消化杂志*, 2020, 28:203-209.
- [6] 张海平, 杨莉佳, 陶诗沁, 等. 实时荧光PCR检测病原真菌方法的建立及其临床应用[J]. *基础医学与临床*, 2009, 29:1327-1328.
- [7] 黄永杰, 谢林森, 崔玲玲, 等. 痰真菌培养联合G试验

- 与 GM 试验对侵袭性真菌感染诊断价值[J].中华医院感染学杂志, 2019, 29:3225-3228.
- [8] 马兴璇, 唐石伏, 阳建伶, 等. (1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖实验干扰因素的研究进展[J].中国当代医药, 2020, 27: 21-23.
- [9] Adachi Y, Ishii M, Kanno T, *et al.* N-terminal (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-glucan recognition proteins from insects recognize the difference in ultra-structures of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-glucan[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20:3498-3512.
- [10] 唐晓丹, 李光辉. 2016 年美国感染病学会曲霉病诊断处理实践指南[J].中国抗感染化疗杂志, 2017, 17: 456-463.
- [11] 岳磊, 朱秀梅, 张婷, 等. 重症监护病房患者侵袭性真菌感染情况分析[J].检验医学与临床, 2019, 16: 2837-2839.
- [12] 杨斐, 李红宾, 曹立娟, 等. 医院内侵袭性真菌感染现状[J].皮肤病与性病, 2019, 41:666-669.
- [13] 李占甲, 翟红岩, 陈水平. G 试验在侵袭性真菌病诊断中的最新进展[J].检验医学, 2019, 34:859-863.
- [14] Anjugam M, Vaseeharan B, Iswarya A, *et al.* Biological synthesis of silver nanoparticles using  $\beta$ -1, 3 glucan binding protein and their antibacterial, antibiofilm and cytotoxic potential[J].Microb Pathog, 2018, 115:31-40.
- [15] Tissot F, Lamoth F, Hauser PM, *et al.* Beta-glucan antigenemia anticipates diagnosis of blood culture-negative intraabdominal candidiasis[J].Am J Respir Crit Care Med, 2013, 188:1100-1109.
- [16] Tran T, Beal SG. Application of the 1, 3-beta-D-glucan (Fungitell) assay in the diagnosis of invasive fungal infections[J].Arch Pathol Lab Med, 2016, 140: 181-185.
- [17] Cohen JF, Ouziel A, Matczak S, *et al.* Diagnostic accuracy of serum (1,3)-beta-d-glucan for neonatal invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis[J]. Clin Microbiol Infect, 2020, 26:291-298.

## 本刊稿件格式要求(1)

**1.1 题名:**应与内容相符,言简意赅,体现创新点或主要结论,避免过大、空泛,一般不超过 20 个汉字,不用副标题。英文题名应与中文一致,除专有名词外,只第 1 个词的首字母大写,其他均小写。

**1.2 基金:**在首页页脚标注所受资助的基金项目及编号。

例:基金项目:国家自然科学基金(39470325)。

**1.3 作者:**应是对文章做出贡献、能对内容负责者,一般 $\leq 7$ 个。如有不同单位作者,在右上角标注不同数字以区别。通信作者以“\*”标注。作者英文的“姓”需用全称并且大写,“名”的第 1 个字拼音的首字母大写,后面均用小写,两字之间用连字符。

例:WANG Xiao-san。

**1.4 作者单位:**

**1.4.1 中文:**写标准全称(由大单位到小单位,中间用空格隔开)、所在省份、城市及邮编。如有不同单位,以作者右上角标的数字对应标注单位。

例:华中科技大学 同济医学院 1. 免疫学系;2. 病理生理学系,湖北 武汉 430022

**1.4.2 英文:**由小单位到大单位,中间用“,”隔开,省份略去。每个实义词的首字母大写。

例:1. Department of Immunology; 2. Department of Pathophysiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China