ICS 11.020
CCS C 50

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 497—2026
代替 WS/T 497—2017

侵袭性真菌病实验诊断标准

Standard for laboratory diagnosis of invasive fungal disease

2026-05-25 发布　　2026-11-01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会　　发布

前　言

本标准为推荐性标准。

本标准代替 WS/T 497—2017《侵袭性真菌病临床实验室诊断操作指南》，与WS/T 497—2017相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

——增加了术语“酵母菌”“丝状真菌”“双相真菌”“菌丝”“假菌丝”和“孢子”（见3.2～3.7）；

——删除了术语“最小抑菌浓度”“剂量依赖敏感”“最低有效浓度”和“折点”（见2017年版的2.2～2.5）；

——增加了缩略语（见第4章）；

——更改了标本采集、运送及处理的要求（见第5章，2017年版的第3章）；

——增加了标本直接镜检常用染色方法的特点和应用描述（见6.2）；

——更改了标本直接镜检的结果解释（见6.3，2017年版的4.3）；

——更改了真菌培养技术要求（见第7章，2017年版的第5章）；

——更改了培养后菌种鉴定技术要求（见第8章，2017年版的第6章）；

——更改了真菌1,3-β-D-葡聚糖检测（G试验）、曲霉半乳甘露聚糖检测（GM试验）、隐球菌荚膜多糖抗原检测和标本直接核酸检测的方法描述（见9.2.1～9.2.3、9.4，2017年版的7.1～7.4）；

——增加了念珠菌甘露聚糖抗原、曲霉特异性IgG抗体、曲霉特异性IgE抗体和念珠菌特异性IgG抗体检测方法的描述（见9.2.4、9.3）；

——删除了真菌药敏试验方法技术要求（见2017年版的第8章）；

——增加了酵母菌和丝状真菌天然耐药描述及不同标本中念珠菌属药敏结果报告原则（见10.3、10.4）；

——增加了生物安全要求（见第11章）；

——增加了质量控制（见第12章）。

本标准由国家卫生健康标准委员会临床检验标准专业委员会负责技术审查和技术咨询，由国家卫生健康委医疗管理服务指导中心负责协调性和格式审查，由国家卫生健康委医政司负责业务管理、法规司负责统筹管理。

本标准起草单位：中国医学科学院北京协和医院、北京大学人民医院、广西医科大学第一附属医院、中南大学湘雅医院、中山大学附属第一医院、重庆医科大学附属第一医院、甘肃省人民医院、北京大学第一医院。

本标准主要起草人：徐英春、王瑶、张丽、王辉、曹存巍、刘文恩、廖康、夏云、魏莲花、李若瑜。

本标准于2017年首次发布，本次为第一次修订。

侵袭性真菌病实验诊断标准

1 范围

本标准规定了侵袭性真菌病实验诊断的关键技术要求。

本标准适用于医疗机构临床实验室开展侵袭性真菌病的实验诊断。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

WS/T 411 抗丝状真菌药物敏感性试验标准 肉汤稀释法

WS/T 421 抗酵母样真菌药物敏感试验标准 肉汤稀释法

WS/T 442 临床实验室生物安全指南

WS/T 489 尿液标本临床微生物实验室检验操作指南

WS/T 503 临床微生物实验室血培养操作规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

侵袭性真菌病invasive fungal disease

真菌侵入人体，在组织、器官或血液中生长、繁殖，并导致炎症反应及组织损伤的感染性疾病。

3.2

酵母菌 yeast

单细胞真菌，细胞圆形或卵圆形，无性繁殖主要通过芽殖或分裂进行，产生酵母细胞。

注：临床常见酵母菌主要包括念珠菌属、隐球菌属和毛孢子菌属等真菌。

3.3

丝状真菌 filamentous fungi

多细胞真菌，主要由菌丝和孢子组成，菌丝延长分枝，交织成团，形成分枝繁茂的菌丝体。

注：又称霉菌，临床常见丝状真菌包括曲霉属、镰刀菌属和毛霉目等真菌。

3.4

双相真菌 dimorphic fungi

在不同培养温度下，可呈现酵母相和菌丝相两种形态。35 ℃～37 ℃培养或在宿主体内呈酵母相，28 ℃～30 ℃培养呈菌丝相。双相真菌包括马尔尼菲篮状菌、组织胞浆菌属、球孢子菌属、副球孢子菌属、芽生菌属和孢子丝菌属等。

3.5

菌丝 hyphae

组成真菌菌丝体的独立丝状或管状结构，有隔或无隔。细胞壁通常平行，在分隔处没有内陷。菌丝顶端通过有丝分裂生长延长，末端细胞通常为圆柱形。菌丝分枝起始处没有缩窄，第一个分隔处距离分枝起始处有一定距离。

注：即真菌丝。

3.6

假菌丝 pseudohyphae

由一串延长的芽生孢子相互连接，形成类似菌丝的结构，连接处缩窄。在出芽过程中形成，末端芽生孢子通常为圆形或椭圆形。常在念珠菌属中产生。

3.7

孢子 spore

真菌的繁殖结构，通过有性生殖（子囊孢子、担孢子或接合孢子等）或无性生殖（孢子囊孢子、芽生孢子等）产生。

3.8

消化液 digestion solution

用于处理黏稠的标本（如痰液、脓液等）的化学试剂，起溶解黏液的作用，使真菌更易检出，常采用*N*-乙酰-L-半胱氨酸、草酸或二巯基苏糖醇等。

4 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

BALF：支气管肺泡灌洗液（Bronchoalveolar Lavage Fluid）

IGS区：基因间隔区（Intergenic Spacer）

ITS区：内转录间隔区（Internal Transcribed Spacer）

MALDI-TOF MS:基质辅助激光解析电离飞行时间质谱（Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry）

mNGS: 宏基因组高通量测序（Metagenomic Next Generation Sequencing）

PCR：聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）

5 标本采集、运送及处理

5.1 概述

真菌病原学检验的标本采集方法与细菌类似，但采集量要求更高。优先采集无菌部位标本；从有菌部位采集标本时，尽可能减少定植菌群的污染。对于系统性或侵袭性真菌感染，深部标本优于浅部标本，由于菌体常常侵及周围组织，采集组织标本较佳。体液标本离心后使用沉淀物培养可增加真菌检出率。

5.2 血液标本

5.2.1 标本采集和运送

严格皮肤消毒后采集标本，具体按照WS/T 503。宜在抗真菌药物使用前采集静脉血。采集后立即注入血培养瓶内并轻轻摇匀。按血培养瓶推荐的最大量采集，建议使用真菌专用血培养瓶，或采用需氧血培养瓶。2 h内室温送检。

5.2.2 标本处理

具体处理按照WS/T 503。

5.3 骨髓标本

5.3.1 标本采集和运送

推荐采集1 mL～2 mL骨髓液注入需氧或真菌专用血培养瓶，2 h内室温送检。骨髓液涂片检查有重要价值，建议接种培养瓶后床旁直接制备涂片。

5.3.2 标本处理

培养标本具体处理按照WS/T 503。对于骨髓涂片，除革兰染色外，建议同时做吉姆萨或瑞氏染色，有条件可加做钙荧光白染色。

5.4 静脉导管标本

5.4.1 标本采集和运送

剪取导管尖端5 cm置于无菌容器中。15 min内室温送检；若不能及时送检，2 ℃～8 ℃保存应≤2 h。

5.4.2 标本处理

导管尖在琼脂平板表面滚动4次，做半定量培养。不应使用含放线菌酮的培养基。

5.5 无菌体液（脑脊液、腹水、胸水、心包液和关节液等）标本

5.5.1 标本采集和运送

脑脊液标本采集需注意适应证和禁忌证，无菌螺帽管采集≥2 mL，15 min内室温送检。胸水、腹水尽量采集≥10 mL，心包液和关节液采集≥1 mL，2 h内室温送检。若不能及时送检，室温保存应≤24 h。无菌体液标本也可选择直接接种于血培养瓶，具体要求参见WS/T 503。

5.5.2 标本处理

若标本≥2 mL，宜2000×*g*离心10 min，取沉淀物接种；若标本量＜2 mL，则将标本直接接种于培养基。若有凝块先研磨后再接种。宜使用细胞离心机对无菌体液进行制片镜检（血性标本除外）。

5.6 脓液、引流液、窦道及创面分泌物

5.6.1 标本采集和运送

开放性创口，用无菌生理盐水冲洗创面后，采集病灶活动性边缘组织标本；封闭性脓肿，局部皮肤消毒后，用注射器抽取脓液，转移至无菌容器内。2 h内室温送检；若不能及时送检，室温保存应≤24 h。

5.6.2 标本处理

将标本直接接种于培养基。如有颗粒，应记录颗粒颜色，采集颗粒并用无菌生理盐水清洗后，压碎进行镜检及培养。较浓稠的标本应使用消化液预处理。

5.7 下呼吸道标本

5.7.1 标本采集和运送

清洁口腔后，采集自气管深部咳出的痰，尽量采集晨痰，标本量应≥1 mL；采用支气管镜进行支气管毛刷取样和BALF采集。2 h内室温送检；若不能及时送检，2 ℃～8 ℃保存应≤24 h。

5.7.2 标本处理

将标本接种至含抗菌药物的选择性培养基中。较黏稠的下呼吸道标本应先使用消化液处理，再经2000×g离心10 min后取沉淀物接种，可提高阳性率。

5.8 眼部标本

5.8.1 标本采集和运送

宜采集角膜刮取物、玻璃体液和前房液，15 min内室温送检；若不能及时送检，室温保存应≤24 h。角膜刮取物推荐床旁接种培养基和制备涂片。

5.8.2 标本处理

角膜刮取物：通常标本量很少，以“X”或“C”形接种于非选择性培养基，不应使用含放线菌酮的培养基。

玻璃体液常因冲洗被稀释，建议离心后取沉淀物涂片和接种。

5.9 组织标本

5.9.1 标本采集和运送

采集足够量的组织标本，宜≥1 cm^3。标本采集后使用无菌容器转运，宜滴数滴无菌生理盐水保持组织湿润，不能使用福尔马林固定。15 min内室温送检；若不能及时送检，室温保存应≤24 h。

5.9.2 标本处理

处理组织标本时，一般采用无菌剪刀剪碎组织（避免研磨）后接种，尤其怀疑毛霉目真菌感染时，不可研磨；若怀疑组织胞浆菌等胞内菌感染，则应研磨组织后培养。如标本量充足，建议将剪碎的组织和研磨的组织混合后接种，以兼顾不同真菌的生长。一般采用点种方式接种于平板培养基。对于显微镜检查，组织标本需要研磨后进行涂片制备。

5.10 尿液标本

5.10.1 标本采集和运送

可采集早晨第一次清洁中段尿、耻骨上膀胱穿刺尿、导管穿刺尿或前列腺按摩后采集的尿液，最佳采集量为10 mL～50 mL。具体标本采集方式按照WS/T 489操作。2 h内室温送检；若不能及时送检，2 ℃～8 ℃保存应≤24 h。

5.10.2 标本处理

如标本量≥2 mL，宜2000×*g*离心10 min，取沉淀物进行涂片和接种。如为离心接种，则不进行菌落计数。

5.11 不合格标本处理

5.11.1 下列标本类型不推荐送检真菌培养：

a) 尿管尖端或导尿袋尿液；
b) 恶露；
c) 呕吐物；
d) 结肠造口处分泌物；
e) 胃内容物或胃冲洗物；
f) 粪便标本不宜进行真菌培养，可直接镜检。

5.11.2 以下情况建议拒收：

a) 标本标识与申请单不符，标识错误或无标识；
b) 未采用无菌容器或容器选择不恰当；
c) 标本采集部位未按规定消毒或清洁创口；
d) 标本保存方式不恰当或保存时间超过规定；
e) 标本容器渗漏等。

6 标本直接镜检

6.1 概述

标本直接镜检结果对于评价真菌培养结果和辅助临床决策具有重要作用，推荐同时进行真菌直接镜检和真菌培养。结合患者临床表现，无菌部位标本直接镜检发现真菌，具有诊断意义；非无菌部位标本镜检发现真菌，需评价其临床意义。进行直接镜检时，应先在低倍镜下观察有无酵母细胞、孢子和菌丝，然后在高倍镜下观察孢子和菌丝的形态、颜色、大小和排列等特征。

6.2 染色方法

标本直接镜检常用染色方法见表1。

表1　标本直接镜检查真菌常用染色方法

方法	应用	真菌镜下特点	备注
10%KOH 湿片	可检测酵母菌和丝状真菌。适用于各类标本	透明或暗色酵母细胞、孢子或菌丝	背景干扰大，可能被细胞碎片或黏液掩盖。可与钙荧光白染色联合应用
钙荧光白染色	可检测所有真菌，包括耶氏肺孢子菌（包囊）。适用于各类标本	取决于所用滤光片，真菌为蓝白色或亮绿色，背景为暗色。耶氏肺孢子菌包囊中心有“双括号样”结构	需配备荧光显微镜；钙荧光白染液可与 KOH 混合，易于观察真菌结构；植物纤维、动脉壁等也可产生荧光；应注意耶氏肺孢子菌荧光淬灭速度较快，部分暗色真菌荧光信号弱
荧光抗体染色	采用目标真菌特异性荧光抗体，阳性结果提示特异性目标真菌。可用于检测耶氏肺孢子菌（包囊期和滋养体期）等	可在荧光显微镜下看到产生荧光的菌体	需配备荧光显微镜
革兰染色	可检测部分真菌。适用于各类标本	通常酵母菌和假菌丝为革兰阳性。丝状真菌菌丝为革兰阴性，但有时不易着色	对丝状真菌和隐球菌检测敏感性较低，隐球菌某些情况下染色较弱，仅表现为颗粒状染色，通常有橙色无定形物质围绕酵母细胞。一般不推荐革兰染色用于丝状真菌和隐球菌检测
墨汁染色	检测隐球菌。适用于脑脊液等	酵母细胞周围可见透明荚膜，背景为黑色。有时可见出芽	注意与标本中的细胞鉴别；部分菌体荚膜较窄；红酵母属也可能有荚膜
六胺银染色	检测多种真菌，包括耶氏肺孢子菌。适用于各类标本，包括石蜡包埋组织切片	各种真菌，包括肺孢子菌包囊，被染为灰白色至黑色，背景为绿色或红棕色	如染色过深，可能无法观察真菌细微结构
苏木素-伊红（HE）染色	常规组织病理学染色，也可观察到真菌结构	通常真菌胞浆为粉色、核为蓝色，暗色真菌为棕色，背景组织为红色	可观察宿主组织对真菌的反应。曲霉属和毛霉目着色较好
过碘酸-雪夫（PAS）染色	多用于检测组织病理切片中的真菌	真菌染为粉色至紫红色；核可为蓝色，取决于所用的复染色	PAS 使糖原染色
吉姆萨染色	多用于检查骨髓和外周血涂片	检测荚膜组织胞浆菌，常在巨噬细胞内见卵圆形酵母细胞，透明晕为染色不佳的细胞壁。检测马尔尼菲篮状菌，常在巨噬细胞内见圆形、椭圆形或腊肠形有明显横隔的酵母细胞。也可检测肺孢子菌的滋养体阶段	也可采用瑞氏-吉姆萨染色
黏蛋白卡红染色	多用于检测组织病理切片中的隐球菌	隐球菌荚膜染为亮红色	也可使皮炎芽生菌细胞壁染色

6.3 结果解释

标本直接镜检见到不同真菌结构和形态特征具有不同的提示意义，具体参考如下：

a) 酵母细胞：提示酵母菌；
b) 酵母细胞及假菌丝：多提示念珠菌属；
c) 有厚荚膜的酵母细胞：多提示隐球菌属；
d) 透明、有隔菌丝，呈45°鹿角样分枝：多提示曲霉属；
e) 透明、无隔或少隔菌丝，菌丝宽大，直角分枝：提示毛霉目真菌；
f) 棕色/黑色菌丝或孢子：提示暗色真菌；
g) 圆形、卵圆形或腊肠形的酵母细胞，部分菌体中间可见明显横隔，常在巨噬细胞内：提示马尔尼菲篮状菌；
h) 圆形或卵圆形、芽生酵母细胞，菌体周围有似荚膜的亮晕，常在巨噬细胞内：提示荚膜组织胞浆菌。

7 真菌培养

7.1 真菌培养基种类

7.1.1 沙保弱琼脂：可用于酵母菌、双相真菌和丝状真菌的分离培养。添加氯霉素或庆大霉素等抗菌药物可抑制细菌生长。添加放线菌酮可抑制腐生真菌的生长，有助于检出致病真菌，但也可能会抑制某些条件致病真菌如镰刀菌、部分曲霉、隐球菌和部分念珠菌等的生长。马拉色菌属培养需要添加橄榄油。

7.1.2 脑心浸液琼脂：可加5%～10%羊血，用于包括苛养的双相真菌、隐球菌属等在内的各类真菌的分离培养，及双相真菌菌丝相与酵母相的转换培养。常添加氯霉素和庆大霉素等。

7.1.3 马铃薯葡萄糖琼脂：可有效刺激真菌产孢，多用于丝状真菌的培养鉴定。常添加放线菌酮、氯霉素和庆大霉素等。

7.1.4 念珠菌显色培养基：根据不同颜色鉴定部分念珠菌菌种。

7.1.5 其他培养基：咖啡酸琼脂、抑制性霉菌琼脂和察氏培养基等。

7.2 接种要求

真菌培养基主要分为平板培养基和带螺帽斜面培养基，要求如下。

a) 平板培养基：标本接种面积较大，有利于空气交换，能更好地观察混合菌生长和菌落形态。平板边缘易被空气中的真菌污染，应避免在平板边缘1 cm内接种和划线。接种完成后使用透气封口膜进行密封，有助于防止培养基干燥，避免孢子逸出污染环境。
b) 斜面培养基：培养基的试管直径应＞2 cm，斜面培养基的接种面积相对较小，但密封性优于平板培养基，不易干燥，适合丝状真菌或慢生长真菌的长期培养。标本接种后管盖避免拧过紧，以保证有足够的空气交换。接种液体标本后，保持培养基斜面呈水平放置，待标本干燥后再直立。注意由于接种面积较小，病原真菌可能被其他微生物覆盖而漏检。

7.3 培养温度

真菌培养的温度要求如下。

a) 初代培养一般建议28 ℃～30 ℃培养，保持湿度，避免培养基干燥。通常不需要同时在28 ℃～30 ℃和35 ℃～37 ℃培养，但为加快曲霉属生长速度，或抑制腐生真菌生长时，可考虑增加35 ℃～37 ℃培养。
b) 若怀疑双相真菌感染，应同时在28 ℃～30 ℃和35 ℃～37 ℃培养。
c) 马拉色菌属最佳培养温度为33 ℃±1 ℃。
d) 念珠菌显色培养基和自动化血培养系统中的血培养瓶培养温度按照制造商要求操作。

7.4 常见临床标本真菌培养建议

常见临床标本真菌培养建议见表2。

表 2　临床标本真菌培养建议

标本类型	推荐培养基	读取时间	培养时间
下呼吸道标本、尿液等	含抗生素（氯霉素/庆大霉素）的沙保弱琼脂，可另外接种含放线菌酮的培养基	第1周每天查看，之后每周查看1次	真菌培养时间一般推荐3 周～4 周；念珠菌显色培养基按制造商要求一般培养48 h～72 h，其他培养基上酵母菌一般培养7 d～14 d；怀疑罕见真菌或慢生长真菌（如荚膜组织胞浆菌、皮炎芽生菌等）感染时，建议延长培养至6 周～8 周
	念珠菌显色培养基（可选）		
脑脊液、胸水、腹水、组织等标本	含和/或不含抗生素（氯霉素/庆大霉素）的沙保弱琼脂，含抗生素（氯霉素/庆大霉素）的脑心浸液琼脂。培养基均不添加放线菌酮		
	念珠菌显色培养基（可选）		
血液	需氧血培养瓶或真菌专用血培养瓶	血培养仪自动连续监测	3 周～4 周

8　培养后菌种鉴定

8.1　酵母菌鉴定

8.1.1　概述

基于菌落形态、镜下形态、芽管形成试验结果和念珠菌显色培养基菌落颜色形态等进行初步鉴定，如有条件，推荐首选MALDI- TOF MS或自动化生化鉴定系统进行鉴定。

8.1.2　显色培养基鉴定

念珠菌自身代谢产生的酶与相应色原底物反应，释放出显色基团，使菌落呈现不同颜色。

注：显色培养基对于显色不典型及临床少见念珠菌鉴定不准确，鉴定结果仅供参考。

8.1.3　芽管形成试验鉴定

白念珠菌芽管试验阳性，都柏林念珠菌也可形成芽管，其他念珠菌一般不形成芽管。将念珠菌接种于0.2 mL～0.5 mL人或动物血清中，37 ℃孵育2 h～3 h，镜检观察有无芽管形成。需设立阳性对照（白念珠菌）和阴性对照（热带念珠菌），注意热带念珠菌在血清中孵育6 h或更久也可形成芽管。

8.1.4　生化反应鉴定

根据不同种属微生物理化性质不同，利用不同生化反应鉴别或鉴定微生物种属。常用方法包括手工生化鉴定法和自动化生化鉴定法。

8.1.5　MALDI-TOF MS鉴定

通过检测获得微生物的蛋白质谱图，并将所得的谱图与数据库中的真菌参考谱图比对后得出鉴定结果。酵母菌鉴定推荐靶板提取法。靶板提取法未产生可接受的鉴定结果或出于生物安全考虑时，宜使用甲酸乙腈萃取法处理菌株。一般培养18 h～24 h的酵母菌用于鉴定，而生长较慢的酵母菌可延长培养至48 h。

8.1.6　基因测序鉴定

酵母菌常用鉴定基因包括：真菌内转录间隔区即ITS区（真菌通用）、核糖体大亚基D1/D2 区（真菌通用）、基因间隔区即IGS区（毛孢子菌属和隐球菌属等种水平鉴定）等。

注：部分酵母菌无法通过真菌通用鉴定基因准确鉴定至种水平，需要多个基因联合检测。

8.2　丝状真菌和双相真菌鉴定

8.2.1　概述

丝状真菌和双相真菌主要通过观察菌落形态和生长特性，结合乳酸酚棉蓝染色或小培养后显微镜镜下形态，综合分析后进行形态学鉴定，通常可鉴定到属，常见曲霉可鉴定到复合群，MALDI- TOF MS对于部分常见丝状真菌和双相真菌可鉴定到种水平。

8.2.2 形态学鉴定

8.2.2.1 菌落特征和生长特性

丝状真菌菌落形态观察需结合生长速度和生长温度，正反面观看培养基，观察菌落颜色、质地、高度、边缘形态及渗出物等。

8.2.2.2 乳酸酚棉蓝染色镜检

可鉴定丝状真菌。采用胶带黏取一定量孢子和菌丝，然后将胶带黏在预先滴加乳酸酚棉蓝的载玻片上，显微镜下观察菌丝分枝及分隔情况、颜色、形态、附着结构及产孢方式等。

8.2.2.3 小培养形态学鉴定

真菌小培养可在显微镜下观察菌落的自然生长和产孢状态，利于发现真菌特征性表现，方法包括琼脂块法、钢圈法及改良的商品化方法等。以琼脂块法为例，操作步骤如下：

a) 将刀片消毒，在马铃薯琼脂培养基上切一小块约 0.5 cm^2的琼脂块，放在灭菌载玻片上；
b) 用接种针挑取待测菌株的少量菌丝（肉眼可见即可），接种在琼脂块的四边；
c) 将灭菌后的盖玻片置于琼脂块表面；
d) 在无菌平皿中放入无菌的玻璃棒（或其他支持物），加适量无菌水或含水棉球、纱布，将载玻片放入无菌平皿的支持物上，盖上无菌平皿盖；
e) 28 ℃～30 ℃培养，每天观察至产孢良好或菌丝丰富时，取盖玻片进行制片，显微镜观察。

8.2.3 MALDI-TOF MS 鉴定

可通过甲酸乙腈萃取法、双甲酸法等进行前处理，必要时使用无菌磁珠辅助破壁。丝状真菌应培养至长出明显菌丝，产孢前或刚产孢时鉴定最佳。

8.2.4 基因测序鉴定

丝状真菌常用鉴定基因包括：ITS区（真菌通用）、β-微管蛋白（曲霉属、青霉属、赛多孢霉属等种水平鉴定）、钙调蛋白（曲霉属种水平鉴定）和转录延长因子-1α （镰刀菌属种水平鉴定）等。

注：部分丝状真菌无法通过真菌通用鉴定基因准确鉴定至种水平，需要多个基因联合检测。

8.3 培养鉴定结果解释

8.3.1 实验室培养出的真菌可能是定植菌、污染菌或病原菌。分离真菌的临床意义取决于以下方面：

a) 分离的菌种和致病力；
b) 标本类型和采集方式；
c) 患者免疫状态和/或近期接受免疫抑制剂、糖皮质激素等治疗情况；
d) 患者临床表现和既往史；
e) 患者的职业和暴露情况、旅居史；
f) 近期抗微生物药物治疗情况等。

8.3.2 其他支持真菌感染的证据包括：

a) 标本直接镜检发现真菌或宿主反应；
b) 不同部位检出同种真菌或同一部位多次检出同种真菌；
c) 菌株的生长量有提示意义，但需结合临床；
d) 菌落生长在接种线或接种点上；
e) 血清学检验结果支持；
f) 从免疫功能严重受损的患者中分离出真菌，尤其是 T 淋巴细胞缺陷或中性粒细胞减少的患者。

8.3.3 从血液分离出真菌高度提示与疾病相关，尤其检出镰刀菌属、念珠菌属、隐球菌属、双相真菌、拟青霉属/紫孢霉属、单孢瓶霉属、帚枝霉属/枝顶孢属和毛孢子菌属等通常具有重要临床意义。但血中分离出青霉属、枝孢霉属、曲霉属（除外土曲霉），多考虑污染。

8.3.4　无菌部位标本在皮肤采样、运输、处理过程中也可能发生污染，应结合多个标本或多个培养基的结果及菌种致病性等，分析所分离真菌是否有临床意义。

8.3.5　呼吸道标本（痰、BALF 等）分离到丝状真菌，较难判断临床意义，需要结合临床综合分析，如患者免疫状态等。呼吸道分离到酵母菌常提示定植（隐球菌和双相真菌除外）；分离到耳念珠菌可考虑报告临床，并提示可能为定植菌。

8.3.6　尿液标本中检出隐球菌属、曲霉属、毛霉目、组织胞浆菌属等，提示患者可能存在侵袭性或播散性感染。念珠菌属多引起尿路一过性定植或污染，念珠菌属尿路感染的诊断需要结合临床表现、影像学检查、膀胱镜或手术探查结果综合分析判断。

8.3.7　培养基中仅分离出单个菌落，如不在接种线上，考虑污染，不报告临床；如在接种线上，结合临床考虑可能是致病菌时，应报告临床。

9　非培养检测方法

9.1　概述

真菌非培养检测主要包括抗原、抗体和核酸检测等，是辅助诊断侵袭性真菌病的重要方法。不同检测方法的具体操作参考制造商说明。本部分内容主要包括检测原理、标本类型和影响因素等，建议在报告中备注检测方法的影响因素。

9.2　抗原检测

9.2.1　真菌 1,3-β-D-葡聚糖检测（G 试验）

9.2.1.1　检测方法和标本类型

1,3-β-D-葡聚糖广泛存在于真菌细胞壁中，侵袭性真菌病患者血液中1,3-β-D-葡聚糖可升高，检测方法包括基于鲎试验的动态比浊法或动态比色法、化学发光免疫法等。检测标本为血清等，基于鲎试验的检测方法需采用无热原采血管。

9.2.1.2　临床应用和影响因素

G试验是辅助诊断侵袭性真菌病的重要方法。G试验在念珠菌属、曲霉属、镰刀菌属、枝顶孢属、暗色真菌、耶氏肺孢子菌等感染时都可升高，但不适用于隐球菌病和毛霉病的辅助诊断。推荐对高危患者进行动态监测，可每周检测1次～2次。血液透析、腹膜透析、棉制品、免疫球蛋白、蘑菇多糖等可能导致G试验假阳性。使用棘白菌素类等抗真菌药物可能导致假阴性。

9.2.2　曲霉半乳甘露聚糖检测（GM 试验）

9.2.2.1　检测方法和标本类型

半乳甘露聚糖是存在于曲霉细胞壁上的特异性多糖抗原，可采用酶联免疫分析法、免疫层析法或化学发光法等检测。检测标本为血清和BALF等。对于非粒缺患者或已接受唑类药物治疗的患者，怀疑肺部曲霉感染时，因血清GM试验敏感性低，建议送检BALF GM试验。

9.2.2.2　临床应用和影响因素

GM试验是辅助诊断侵袭性曲霉病的重要方法。推荐对高危患者进行动态监测，可每周检测1次～2次。曲霉半乳甘露聚糖抗原与其他真菌（如青霉、篮状菌、镰刀菌等）抗原成分有交叉，可能导致假阳性；患者应用哌拉西林/他唑巴坦等药物、食用曲霉污染的谷类或牛奶等也可能导致假阳性。免疫功能正常的非粒细胞缺乏患者、应用抗真菌药物治疗等可能导致假阴性。

9.2.3　隐球菌荚膜多糖抗原检测

9.2.3.1　检测方法和标本类型

荚膜多糖是存在于隐球菌细胞壁上的特异性多糖抗原，可采用酶联免疫分析法、免疫层析法和化学发光法等检测。检测标本为脑脊液和血清等。

9.2.3.2 临床应用和影响因素

脑脊液或血清标本隐球菌荚膜多糖抗原阳性，可作为隐球菌病确诊证据之一。动态监测荚膜多糖抗原滴度，结合临床因素可作为启动治疗和调整治疗方案的证据，但滴度变化及转阴不能作为停药指标，是否停药以微生物学检查和临床改善情况为准。系统性红斑狼疮、类风湿因子阳性、HIV感染、恶性肿瘤等宿主基础疾病，接受羟乙基淀粉治疗等可导致假阳性。抗原浓度过高引起的“后带现象”可导致假阴性。

9.2.4 念珠菌甘露聚糖抗原检测

9.2.4.1 检测方法和标本类型

甘露聚糖是存在于念珠菌细胞壁上的特异性多糖抗原，可采用酶联免疫分析法、免疫层析法和化学发光法等检测。检测标本为血清。

9.2.4.2 临床应用和影响因素

早期辅助诊断侵袭性念珠菌感染，有助于区分念珠菌定植或感染。抗病毒药物阿昔洛韦、伐昔洛韦等可能导致假阳性。

9.3 抗体检测

9.3.1 曲霉特异性 IgG 抗体检测

9.3.1.1 检测方法和标本类型

曲霉特异性IgG抗体是人体感染曲霉后产生的特异性抗体，可采用酶联免疫分析法、免疫层析法和化学发光法等检测。检测标本为血清。

9.3.1.2 临床应用和影响因素

曲霉特异性IgG抗体是辅助诊断慢性肺曲霉病和侵袭性曲霉病等的重要方法。组织胞浆菌属或球孢子菌属交叉感染、输注血液制品或免疫球蛋白等可能造成抗体检测假阳性。急性感染期抗体检测可能阴性。

9.3.2 曲霉特异性 IgE 抗体检测

9.3.2.1 检测方法和标本类型

曲霉特异性IgE抗体是变应性支气管肺曲霉病产生的特异性抗体。可采用酶联免疫分析法、免疫层析法和化学发光法等检测。检测标本为血清。

9.3.2.2 临床应用和影响因素

曲霉特异性IgE水平升高，可作为变应性支气管肺曲霉病诊断的微生物学证据。普通裂褶菌感染引起的变应性支气管肺真菌病可导致假阳性。

9.3.3 念珠菌特异性 IgG 抗体检测

9.3.3.1 检测方法和标本类型

念珠菌特异性IgG抗体是人体感染念珠菌后产生的一种特异性抗体，可采用酶联免疫分析法、免疫层析法和化学发光法等检测。检测标本为血清。

9.3.3.2 临床应用和影响因素

推荐念珠菌特异性抗体和抗原同时检测，作为侵袭性念珠菌病的早期诊断手段。接受血液制品、免疫球蛋白治疗等可能造成假阳性。免疫功能低下患者可能出现假阴性。

9.4 标本直接核酸检测

9.4.1 核酸扩增检测

9.4.1.1 检测方法和标本类型

核酸扩增检测方法如荧光定量PCR检测灵敏度高，可用于念珠菌属、隐球菌属、曲霉属和耶氏肺孢子菌等检测。检测标本为血液、组织、无菌体液或BALF等。

9.4.1.2 临床应用和影响因素

血液或BALF标本曲霉PCR检测、脑脊液或BALF标本隐球菌PCR检测、BALF标本耶氏肺孢子菌PCR检测和血液标本念珠菌PCR检测等，可作为相关真菌感染的辅助诊断方法。需避免污染导致的假阳性。非无菌部位标本检测阳性结果难以区分定植和感染。

9.4.2 高通量测序技术

9.4.2.1 检测方法和标本类型

mNGS通过对临床样本的DNA或RNA进行测序，可无偏倚地检测多种病原微生物（包括病毒、细菌、真菌、非典型病原体和寄生虫等）。检测标本为血液、组织、无菌体液或BALF等。

9.4.2.2 临床应用和影响因素

对于病情危重或怀疑少见病原体感染的患者，在进行传统微生物检测的同时，可考虑送检mNGS。应注意真菌核酸提取效率低（尤其是隐球菌属等），核酸提取过程应加强破壁强度。去宿主操作可能降低胞内菌检测敏感性。如真菌检测读长数较低，应结合其他检查结果及实验室背景微生物核酸等进行综合分析；阴性检测结果不能排除真菌感染。

10 真菌药敏试验

10.1 概述

推荐对有致病意义的真菌进行药敏试验，不推荐对可疑定植的真菌（如呼吸道分离的念珠菌属等）进行药敏试验。

10.2 操作程序和判定标准

酵母菌和丝状真菌微量肉汤稀释法药敏试验相关操作及判定标准按照WS/T 411和WS/T 421。商品化药敏试剂参考制造商说明书操作。

10.3 酵母菌和丝状真菌天然耐药

酵母菌和丝状真菌对抗真菌药物的天然耐药见表3，在药敏报告中应注释“耐药”或“天然耐药”。

表 3 酵母菌和丝状真菌对抗真菌药物的天然耐药

菌种	氟康唑	伏立康唑	艾沙康唑	卡泊芬净	米卡芬净	阿尼芬净	两性霉素B	氟胞嘧啶
克柔念珠菌[a]	IR	—	—	—	—	—	—	—
葡萄牙念珠菌	—	—	—	—	—	—	—[b]	—
隐球菌属	—	—	—	IR	IR	IR	—	—
红酵母属	IR	—	—	IR	IR	IR	—	—
毛孢子菌属	—	—	—	IR	IR	IR	—	—
曲霉属	IR	—	—	—	—	—	—	—[c]

表3　酵母菌和丝状真菌对抗真菌药物的天然耐药（续）

菌种	氟康唑	伏立康唑	艾沙康唑	卡泊芬净	米卡芬净	阿尼芬净	两性霉素B	氟胞嘧啶
土曲霉	IR	—	—	—	—	—	—[d]	—[c]
多育节荚孢霉	IR	—	IR	IR	IR	IR	IR	—
毛霉目[e]	IR	IR	—	IR	IR	IR	—	—
淡紫紫孢霉	—	—	—	—	—	—	IR	—
波氏赛多孢	—	—	—	—	—	—	IR	—

注1：IR，天然耐药。
注2：—，无天然耐药。

[a] 克柔念珠菌即库德里阿兹威毕赤酵母。
[b] 葡萄牙念珠菌对两性霉素 B 非天然耐药，但在体内治疗过程中可能产生耐药性。
[c] 不推荐检测曲霉属对氟胞嘧啶的敏感性。
[d] 土曲霉对两性霉素 B 的低 MIC 与临床预后无明确相关性，不推荐常规检测，指南也不推荐用于治疗。
[e] 包括小克银汉霉属、横梗霉属、毛霉属、根毛霉属和根霉属等。

10.4　不同标本中念珠菌属药敏试验结果报告原则

分离自不同标本类型的念珠菌属药敏试验结果报告原则见表4。

表 4　不同标本中念珠菌属药敏试验结果报告原则

抗真菌药物	标本	报告	评论	备注
两性霉素 B	尿	无报告限制	两性霉素 B 脂质制剂不能达到足够的尿液浓度，不用于治疗尿路感染	研究报道全身给药后，两性霉素 B 脱氧胆酸盐的尿液回收率高，两性霉素 B 脂质制剂尿液回收率较低
5-氟胞嘧啶	——	无报告限制	5-氟胞嘧啶不应单独用于严重念珠菌感染的治疗，因为可能会迅速产生耐药性。很少用于新生儿	——
唑类	脑组织、脓肿、脑脊液	常规仅报告氟康唑和伏立康唑	——	由于临床数据有限，仅应临床要求时报告伊曲康唑、泊沙康唑和艾沙康唑的结果
	眼部（角膜、房水、玻璃体）	常规仅报告氟康唑和伏立康唑	——	由于临床数据有限，仅应临床要求时报告伊曲康唑、泊沙康唑和艾沙康唑的结果
	尿	只报告氟康唑	——	仅应临床要求时报告其他唑类药物结果
棘白菌素类	脑组织、脓肿、脑脊液	无报告限制	棘白菌素类在脑脊液和中枢神经系统组织中的渗透不理想。应咨询药师或感染医师	动物模型试验显示中枢神经系统有些部位的药物浓度有可能产生抗念珠菌效果
	眼部（角膜、房水、玻璃体）	不常规报告	棘白菌素类组织渗透性很小，其全身给药方式不推荐用于眼部感染。应咨询药师或感染医师	——
	尿	不常规报告	——	一般不推荐棘白菌素类用于治疗念珠菌尿路感染。仅应临床要求时进行检测和报告

注：未列出的标本类型，暂无报告限制。

11 生物安全要求

11.1 真菌检验相关实验活动应在生物安全二级实验室进行，应符合 WS/T 442 相关规定。

11.2 可能含有高致病性真菌（如皮炎芽生菌、粗球孢子菌、波萨达斯球孢子菌、荚膜组织胞浆菌、巴西副球孢子菌等）的临床样本，个人严格防护下可在二级生物安全柜内进行初始接种和直接检查。得到初步鉴定结果后，不应继续在生物安全二级实验室开展其他活菌操作，如菌株传代培养等。处理高致病性真菌后，应对标本、培养物等进行灭菌，对实验室环境进行消毒。

11.3 丝状真菌检测应配置独立的二级生物安全柜，建议设置独立真菌检测区域或独立真菌实验室。实验室宜保持负压，使气流由清洁区流向污染区。丝状真菌培养物处理的注意事项包括：

a) 建议使用带帽斜面培养基或封口膜密封的平板培养基；
b) 丝状真菌培养物不能在生物安全柜以外打开；
c) 在生物安全柜内处理丝状真菌时，建议备消毒湿巾以处理可能逸出的孢子，防止扩散；
d) 丝状真菌培养平板/斜面需定期查看，防止菌落过度生长和孢子逸出；
e) 禁止嗅闻培养物，以免吸入致病性孢子；
f) 建议使用具有杀菌作用的染液进行丝状真菌镜检；
g) 实验室外标本及培养物的运输需符合相关生物安全要求；
h) 丝状真菌培养物运输应采用斜面培养基。

12 质量控制

12.1 真菌直接镜检质控

12.1.1 质控频率

使用新批次、新货次染液应进行质控，日常质控推荐至少每周进行1次，如检测频率低于每周1次，可在实验当日进行质控。

12.1.2 质控品及预期结果

使用不同染色方法进行直接镜检查真菌，所采用的质控菌株及预期结果见表5。

表 5 标本直接镜检查真菌常用染色方法质控要求

染色方法	质控菌株[a]	预期结果
钙荧光白染色	白念珠菌	可见有荧光信号的酵母细胞和/或假菌丝
	大肠埃希菌	无荧光信号
革兰染色	金黄色葡萄球菌	革兰阳性球菌（紫色）
	大肠埃希菌	革兰阴性杆菌（粉红色）
墨汁染色	新型隐球菌[b]	酵母细胞具有清晰的界线分明的光晕
	白念珠菌	酵母细胞有模糊的、不规则的光晕或没有光晕
KOH湿片	白念珠菌	可见酵母细胞和/或假菌丝
六胺银染色	白念珠菌，或耶氏肺孢子菌阳性标本（灭活）	灰黑色酵母细胞和/或假菌丝，肺孢子菌包囊
	大肠埃希菌	不着色

[a] 推荐质控菌株：白念珠菌 ATCC90028 或白念珠菌 ATCC60193、大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、新型隐球菌 ATCC32045，也可使用其他标准菌株、参考菌株或经基因测序验证鉴定结果的临床分离株。
[b] 推荐采用脑心浸液培养的新型隐球菌或隐球菌阳性标本，荚膜较为明显。

12.2 培养基质控

12.2.1 质控频率

使用新批次、新货次培养基时进行质控。

12.2.2 质控品及预期结果

不同培养基所采用的质控菌株及预期结果见表6。

表 6 真菌培养基质控要求

培养基	质控菌株[a]	孵育要求	预期结果
沙保弱琼脂	白念珠菌	28 ℃～30 ℃培养1 d～3 d	生长
	曲霉属		生长
沙保弱琼脂（含庆大霉素或氯霉素）、脑心浸液琼脂（含庆大霉素或氯霉素）	白念珠菌	28 ℃～30 ℃培养1 d～3 d	生长
	曲霉属		生长
	大肠埃希菌		不生长
念珠菌显色培养基	白念珠菌 克柔念珠菌 热带念珠菌	35 ℃～37 ℃培养2 d～3 d	菌落颜色参考制造商说明
	铜绿假单胞菌		不生长
马铃薯葡萄糖琼脂	白念珠菌	28 ℃～30 ℃培养1 d～3 d	生长

[a] 推荐质控菌株：白念珠菌 ATCC90028 或白念珠菌 ATCC60193、克柔念珠菌 ATCC6258、热带念珠菌 ATCC750、烟曲霉 ATCC MYA-3626、大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853，也可使用其他标准菌株、参考菌株或经基因测序验证鉴定结果的临床分离株。

12.3 真菌药敏试验质控

12.3.1 质控频率

使用新批次、新货次药敏试剂应进行质控。日常质控建议参考制造商具体要求。

12.3.2 质控要求

真菌药敏试验质控要求按照WS/T 421和WS/T 411。

12.4 室内比对

12.4.1 人员比对

由多名人员进行的手工检测或主观判定项目应进行人员比对，包括显微镜检查、培养结果判读、药敏结果读取等。每6个月1次，每次至少5份标本。

12.4.2 设备或方法比对

同一项目使用多台设备或多种方法进行检测时，应进行比对，包括：多种染色方法间比对，手工染片法和自动化染片法比对，不同鉴定方法或设备间比对等。每6个月1次，每次至少5份标本。

12.5 室间质评及室间比对

所有项目均应参加能力验证/室间质评活动，对没有开展能力验证/室间质评的项目，应至少每6个月与其他实验室进行1次实验室间比对。对不合格结果进行分析并采取纠正和预防措施。

参 考 文 献

[1] 人间传染的病原微生物目录（国卫科教发〔2023〕24号）

[2] 李若瑜.医学真菌学－实验室检验规范[M].2版.北京：人民卫生出版社，2022.

[3] 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.

[4] James V. Manual of Clinical Microbiology [M], 13th ed. Washington, DC: ASM Press, 2023.

[5] Carey-Ann D. Burnham, Amy L. Leber. 5th Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM Press.Washington, DC. 2023.

[6] Clinical Laboratory Standards Institute(CLSI).Principles and procedures for detection and culture of fungi in clinical specimens, M54Ed2, 2021.

[7] Clinical Laboratory Standards Institute(CLSI). Principles and procedures for blood cultures, M47ED2, 2022.

[8] Clinical Laboratory Standards Institute(CLSI).Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, M27M44SEd4, 2026.

[9] Clinical Laboratory Standards Institute(CLSI).Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, M38M51SEd4, 2026.

[10] 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.

[11] 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):134-141.

[12] 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物学分会,等.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.

[13] 中华医学会检验医学分会临床微生物学组. MALDI-TOF MS鉴定病原微生物临床应用专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2024, 47(9):1013-1026.

[14] 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与免疫学分会临床微生物学组,中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会.宏基因组高通量测序技术应用于感染性疾病病原检测中国专家共识[J].中华检验医学杂志, 2021, 44(2):14.

[15] 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物学分会.靶向高通量测序在感染性疾病中应用与实践专家共识[J].中华医学杂志, 2024, 104(48):4375-4383.