DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20210204

病原性念珠菌规范化检测的进展及其对生物医学转化的启示

王琦琦，李若瑜，刘伟*

（北京大学第一医院皮肤性病科，国家皮肤与免疫疾病临床医学研究中心，
北京大学真菌和真菌病研究中心，皮肤病分子诊断北京市重点实验室，北京 100034）

【摘要】近年来，机会性真菌感染的发病率逐渐上升，尤其是侵袭性念珠菌病在免疫缺陷宿主中的发生率和死亡率均较高，加上少见和耐药性菌株的出现和逐渐增多，病原性念珠菌的精准检测和鉴定在临床中越来越受重视。除了传统的直接镜检和培养外，依赖于生理学特性而发展的商品化的鉴定方法也发挥了重要作用；另外，基于念珠菌分子生物学理论和技术的发展，诞生了基因扩增和测序、实时定量PCR、mNGS、MALDI-TOF-MS等用于检测和鉴定病原性念珠菌的手段；需引起注意的是，T2 Candida系统被批准在念珠菌血症临床诊断中的应用，显示出病原真菌学与影像学、生物医学工程等专业的交叉与融合。有关病原性念珠菌检测和鉴定方面的这一系列进展，对我国病原真菌学的研究及相关的转化与研发，具有重要的启示，提出了新的努力方向。

【关键词】病原性念珠菌；诊断；鉴定；表型；分子技术

中图分类号：R446.5，R756.5　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2096-8965（2021）02-0024-07

Progress of detection and identification for pathogenic *Candida* species and its enlightenment to biomedical transformation

Wang Qiqi, Li Ruoyu, Liu Wei*

（Department of Dermatology and Venereology, Peking University First Hospital; National Clinical Research Center for Skin and Immune Diseases; Research Center for Medical Mycology, Peking University; Beijing Key Laboratory of Molecular Diagnosis on Dermatoses, Beijing 100034, China）

【Abstract】The incidence of opportunistic fungal infection has been gradually increasing over recent years, especially the high morbidity and mortality of invasive *Candida* infections in immunocompromised individuals. With the emergence and increasing of rare species and drug-resistant strains, the accurate detection and identification of pathogenic *Candida* species have been paid more and more attention in clinical practice. In addition to the traditional direct microscopic examination and culture, the commercial identification methods developed depending on physiological characteristics also play an important role. Moreover, based on the development of molecular biology theory and technology of *Candida* species, some methods for detecting and identifying pathogenic *Candida* species have been generated, such as gene amplification and sequencing, real-time quantitative PCR, mNGS, and MALDI-TOF-MS. It should be noted that T2 Candida system has been approved for clinical diagnosis of candidemia, showing the intersection and integration of pathogenic mycology, medical imaging, and biomedical engineering.

基金项目：国家自然科学基金（81671990；81861148028；81971912）；科技部“艾滋病和肝炎等传染病防治重大专项”（2018ZX10712-001）“创新药物研发重大专项”（2017ZX09304028009）；广西自然科学基金创新研究团队项目“广西亚热带真菌病防治研究”（2020GXNSFGA238001）

通讯作者：刘　伟（1970-），男，甘肃人，博士生导师，主要从事病原真菌与感染的研究。E-mail：liuwei@bjmu.edu.cn

The progress in the detection and identification of pathogenic *Candida* species has important implications and puts forward new efforts for the research of pathogenic mycology and related transformation in China.

【**Keywords**】Pathogenic *Candida* species; Diagnosis; Identification; Phenotype; Molecular techniques

近年来，随着临床上免疫缺陷的宿主不断增多，真菌感染率不断上升，特别是侵袭性真菌病的发病率逐年增加。由于真菌感染的诊断存在困难，常常导致诊断的滞后甚至误诊，从而使患者丧失准确而及时的治疗机会。病原性念珠菌所致的侵袭性念珠菌感染（Invasive *Candida* Infection, ICI）是发病第一位的侵袭性真菌病，在ICU的感染患者中比例达到18%~20%，且死亡率超过70%[1]。由于不同的念珠菌对抗真菌药物的敏感性不同，因此治疗方法不尽相同。因而，快速、准确地鉴定临床常见的念珠菌对于选择用药、指导开展及时、精准的治疗具有重要意义。

传统的念珠菌鉴定方法是基于形态学和生理学特性，这些方法需要在培养阳性的基础上进行，然而临床样本中真菌培养的阳性率不高，且准确鉴定所有菌株往往复杂且耗时。因此，一些人工和自动化的快速商业系统已经被开发用于鉴定临床常见的念珠菌。另外，基于分子生物学发展的新型方法可以准确快速地将念珠菌鉴定到种水平。尽管已有文献对这些方法进行过介绍[2, 3]，但在临床实践中对于病原性真菌的名称、鉴定方法仍然不够规范，譬如将念珠菌称为“假丝酵母”、采用不同培养基和温度下孵育所见的形态特征进行病原真菌菌种鉴定的事例时有所见，这些做法严重影响了所开展工作的准确性，并极大地阻碍了同行之间相关的学术交流。而且，随着新型技术的不断进步及其应用的增多，人们经过临床实践对于各种鉴定方法的理解和认识也在不断完善。因此，深入介绍病原真菌鉴定的规范方法并整理总结人们的最新认识，仍然是十分迫切并具有重要意义的事情，尤其值得注意的是，病原性念珠菌规范化检测方法的一系列进展，对于病原真菌学相关的生物医学转化实践具有重要的启示作用，我们拟通过本文对此进行述评。

1 表型鉴定

1.1 菌落观察和显微镜检查

念珠菌生长较快，一般接种于沙堡弱培养基或土豆培养基，在25℃~30℃下培养2–3 d后可直接观察[4]。观察菌落时要注意：菌落大小、形态、颜色、质地、表面及边缘特征等。根据菌种生物学特性、培养基种类、培养时间和温度不同，菌落可呈现不同形态[4]。对挑取的部分菌落进行乳酸或棉蓝染色后可在显微镜下检查，主要观察孢子、分生孢子、菌丝的数量和形态。不同念珠菌在培养基和显微镜下的形态（见表1）[4]。这些传统的方法，尽管已问世多年，但仍然是念珠菌菌种鉴定最重要的基础方法，是从事相关工作的人员应该规范操作并且严格遵循的。

1.2 显色培养基

科玛嘉显色培养基（CHROMagar）是一类利用微生物自身代谢产生的酶与相应显色底物反应的原理来检测微生物的鉴定用培养基[4]；这些相应的显色底物是由产色基因和微生物部分代谢产物组成，在微生物产生的特异性酶作用下显示特殊颜色，因而通过直接观察菌落颜色即可对菌种作出鉴定；其灵敏度和特异性优于传统培养基。在科玛嘉培养基上30℃~37℃培养48 h后，白念珠菌（*C. albicans*）、热带念珠菌（*C. tropicalis*）、克柔念珠菌（*C. krusei*）的菌落分别呈叶绿色、带紫色光晕的深蓝灰色和粉红色，其它念珠菌如近平滑念珠菌（*C. parapsilosis*）等则从白色到暗粉色不等[4]（见表1）。对于经传统表型特征和生化鉴定不能从白念珠菌中区分的都柏林念珠菌（*C. dubliniensis*），由于在科玛嘉培养基上呈深绿色，故可与之区分[5]；不过，在传代培养或从–70℃中复苏后，都柏林念珠菌可呈现出与白念珠菌相似的淡绿色外观[5]，会影响鉴定结果。有研究表明，改良的显色培养基CHROMagar™ Candida Plus（CHROMagar, France）对耳念珠菌（*C. auris*）鉴定的敏感性和特异性均能达到100%[6]。显色培养基可鉴定的念珠菌种类较少，且结果判读较为主观、容易受培养条件的影响，因此目前只用于临床菌株的初步筛查和判定，未来需要更多的研究和改良，以提高鉴定的准确率。

1.3 温度试验

几乎所有病原性念珠菌在30℃（或室温22℃~25℃）下生长较快较好[4]，因而为培养的最适温度；由于人类的正常体温为37℃，故能否在此温度下生长是酵母菌分类尤其是判断致病性的一个很重要特

表1 念珠菌在培养基中和镜下形态

菌种	菌落形态	镜下形态	显色培养基中颜色
C. albicans	奶油样，光滑，闪光，老后褶皱	有多数芽生孢子，有真菌丝和假菌丝，假菌丝连接处有簇状小分生孢子，顶端或侧壁产生厚壁孢子	淡绿色
C. dubliniensis	奶油样，光滑，闪光	圆形或近圆形芽生孢子，分枝假菌丝和密集的轮生芽生孢子，厚壁孢子大多为末端生	深绿色
C. glabrata	奶油样，光滑，闪光	卵圆形酵母细胞，从尖端发芽，无假菌丝，有芽孢，有时可见串联或分支	粉紫色
C. tropicalis	奶油样，光滑，闪光，老后褶皱	产生假菌丝，芽生分生孢子，孢子稍长	暗蓝灰色
C. parapsilosis	光滑、柔软，陈旧时奶油样，白色或淡黄色，平滑或有褶皱	含大量分支的细长假菌丝，卵圆型或长型小分生孢子	白色或淡粉色
C. krusei	扁平、光滑、柔软，老后黄色，可有褶皱	卵圆形或长型酵母孢子，大量假菌丝，少量分生孢子	淡粉紫色
C. guilliermondii	扁平、光滑、闪光、奶油样，老后黄色或粉色	卵圆型酵母孢子，大量假菌丝和分生孢子，孢子较长，可呈链状或轮状	淡粉紫色

征；另外，在念珠菌鉴定时还经常用到25℃、35℃和40℃。当收集到疑似念珠菌感染的样本后，应该置于25℃和37℃下分别培养，若25℃生长而37℃不生长的菌株通常不致病[7]。值得注意的是，近年来报告的耳念珠菌在42℃中依然生长良好[8]，具有耐高温的特性，而与其亲缘关系较近的希木龙念珠菌（*C. haemulonii*）在高于35℃的环境中长势欠佳[9]，可以对两者进行区分。由于大多数念珠菌生长温度相似，温度试验在临床中仅能作为初步的判断和后续鉴定的基础。

1.4 芽管试验

芽管试验是区分白念珠菌和其它念珠菌的一种简单、经济和有效的方法[10]。白念珠菌在37℃的血清中孵育2–4 h后会产生管状结构，称为芽管或假菌丝，是酵母细胞的非分隔延伸，与真正的菌丝不同，假菌丝的分隔只是两个细胞的交界点。芽管的形成可受到各种因素的影响，如温度、接种量、培养基成分、pH值以及细菌污染等[11]；当白念珠菌在添加人血清的培养基上培养2 h后，可出现芽管试验阳性，敏感性和特异性分别可达98%和100%[12]。不过，一些非白念珠菌如都柏林念珠菌、热带念珠菌和近平滑念珠菌等，也会在血清中产生芽管或假菌丝[13, 14]，故可导致菌种鉴定误差，因此在临床中只能作为初步的判定，且需要与其它方法共同使用才能对病原性念珠菌进行正确鉴定。

1.5 底物同化试验

底物同化试验是利用念珠菌吸收某一组特定基本化合物，譬如碳、氮等，作为唯一生存条件的能力，进而进行念珠菌菌种鉴定的方法。譬如，白念珠菌可同化葡萄糖、麦芽糖、海藻糖、蔗糖、棉籽糖等作为碳源，但不能吸收半乳糖、山梨糖、纤维二糖、阿拉伯糖、乙醇、甘油等，氮源同化试验中不能利用硝酸盐，尿素酶试验阴性[7]；而热带念珠菌可以吸收纤维二糖作为碳源，近平滑念珠菌可吸收阿拉伯糖，克柔念珠菌只同化葡萄糖、不同化其它常见糖和醇、尿素酶试验阳性，据此可用来与其它念珠菌鉴别[7]。虽然该方法简便、经济，但准确率相对较低，且较耗时耗力，在样本量较多的临床诊断实验室中不适合常规开展。

2 商品化的理化鉴定方法

基于念珠菌生长的生理、生化特性，尤其是上述芽管试验和碳源同化试验等，已开发出数种商品化的念珠菌鉴定方法，这些方法具有更方便、更快速鉴定念珠菌的特点，因而在临床上得到广泛应用。下面介绍两种最常用的商品化方法：

2.1 API 20C AUX系统

API 20C AUX系统（bioMerieux Vitek, Hazel-

wood, MO, USA）是基于不同种的念珠菌对于碳源同化的能力不同而开发念珠菌鉴定试剂盒。该试剂盒含有19种不同碳源，加入念珠菌悬液后在30℃孵育24 h、48 h和72 h，根据不同碳源中培养的念珠菌菌落的不同而获得鉴定[15]。都柏林念珠菌由于不能吸收木糖和α-甲基-D-葡萄糖，故借该方法可以将其与白念珠菌区分开[16]。研究显示，API 20C AUX对常见念珠菌的鉴定准确率能够达到97.2%，而对少见念珠菌为61.8%[17]。在某些临床实验室中，API 20C AUX系统常用于大量临床样本的批量鉴定，是鉴定念珠菌的主要方法。但是，该方法需要在接种量、浊度的评估、读数时间的把握等[18]方面进行标准化，以达到更准确地进行菌种鉴定，并且需要增加少见念珠菌的同化试验数据。

2.2 ID 32C系统

ID 32C系统（bioMerieux, Marcyl′ Etoile, France）也是基于底物同化试验的由32孔一次性塑料条组成的试剂盒，包含29项同化试验、63个不同菌种的数据库[15]。该系统在欧洲被广泛用于酵母菌鉴定，研究表明对于来自临床样本中9个属43个种酵母菌的鉴定准确率达到94.8%，与质谱法（96.7%）相近[19]，并在ID 32C的数据库中加入了都柏林念珠菌的碳源同化数据，其敏感性和特异性均较好，能够可靠地鉴定都柏林念珠菌[20]。由于其可鉴定菌种多、鉴定结果较为准确，该系统常被用作其它酵母菌鉴定系统评价比较的参考方法。不过，对于临床少见念珠菌鉴定的准确率只达到60%左右[21]，还存在缺码、种间差异较小的问题。在临床应用中，需配套手册、专用分析系统及专业人员维护等，而且需要分离纯化后鉴定，具有耗时长、成本较高等局限性，限制了其大规模推广使用。

3 分子生物学鉴定方法

随着人类对于病原性念珠菌基因组测序技术发展及其基因组学理论认识的逐步深入，基于基因扩增和测序技术的分子生物学方法也在病原性念珠菌的鉴定中得到发展，且发挥出越来越重要的作用。

3.1 rDNA序列分析

核糖体RNA的基因（rDNA）是一种在种内保守、种间特异的基因，已被广泛作为靶点进行菌种鉴定[22]。其中内转录间隔区（Internal Transcribed Spacer, ITS）序列已经被作为鉴定真菌的公认金标准[23]。对于不同真菌，rDNA基因中其它区域的序列分析可以进行更准确的鉴定，例如毛孢子菌属的Intergenic Spacer 1（IGS1），曲霉属的β-tubulin或翻译延长因子（Translation Elongation Factor, TEF）基因等[23]。研究表明，酵母菌核糖体RNA大亚基D1/D2区域 > 1%的差异通常被认为代表一个新种，ITS区域和D1/D2有相似的种内变异，所以推荐联合使用D1/D2和ITS区域鉴定酵母菌[24]。荷兰皇家文理学院真菌多样性研究中心（CBS-KNAW）对其保藏的9 000余株酵母菌进行rDNA不同区域的序列鉴定，证明相同种间的序列差异 < 1%[25]。由于D1/D2和ITS区域在细胞内拷贝数高，基于这些区域序列的扩增和分析，目前已经广泛应用于念珠菌的鉴定[26-29]，并衍生出多种检测病原性念珠菌的方法，在临床实验室中得到广泛的应用。但仍需在培养阳性的基础上进行，且需要核酸提取和测序技术结合，在条件有限的实验室中尚未常规开展。

3.2 限制性片段长度多态性分析

限制性片段长度多态性分析（Restricted Fragment Length Polymorphism, RFLP）是利用限制性内切酶在特定的核苷酸序列上将双链DNA进行切割，然后进行凝胶电泳，根据片段大小不同将其分开。由于不同物种间核苷酸序列存在差异，酶切位点也随之改变，从而产生的DNA片段长度呈现多态现象。在真菌鉴定中，依据多态性结果可分辨出不同属、种或型。通过扩增角鲨烯环氧化酶基因，PCR产物经BamH I酶切，白念珠菌可产生两个大小分别约为1 kb和500 bp的片段，而其它致病真菌则未见扩增条带，利用这种方法可以特异性鉴定白念珠菌[30]。对9种常见致病性念珠菌的ITS区进行PCR扩增，然后将PCR产物分别经Msp I、Dde I和Hae Ⅲ酶切后各自产生8种、5种和4种特异性带型，可以快速准确地对常见念珠菌进行鉴定[31]。但是，RFLP需要特定的酶切，操作较繁琐，故而在常规临床实践中的应用价值有限。

3.3 Real-time PCR

实时PCR（Real-time PCR）通过使用荧光探针或染料来检测PCR反应产物的数量，该方法用于真菌感染的检测时，相对于传统的PCR具有更高的特异性和敏感性，且能够进行病原体的定量。研究表明，以念珠菌rDNA或CYP450基因为检测靶标，利用Real-time PCR技术能够鉴定常见及少见的念珠菌，敏感性和特异性均能达到90%以上[32]，已成功用于脑脊液中都柏林念珠菌的检

测[33]，可对少见真菌所致脑膜炎作出快速诊断。此外，Real-time PCR对点突变所引起的耐药菌有突出的检测能力，能够在敏感菌株和极低比例（1%）耐药菌株的混合感染中检测出耐药菌株的存在，且特异性高达100%[34]；期待Real-time PCR法在不久的将来可用于耐药念珠菌的检测。不过，由于Real-time PCR能够快速检测出样本中念珠菌的少量DNA，敏感性极高，在检测出现阳性结果时需要结合患者的情况，判断是否为感染、定植，或者假阳性，目前仍需要对其进行标准化等方面的研究，以便进行临床应用。

3.4 T2 Candida系统

T2 Candida系统是PCR和T2 Magnetic Resonance技术的结合，其原理是裂解细胞释放DNA并经PCR扩增，然后被与超顺磁性纳米颗粒共价连接的寡核苷酸探针捕获并相互聚集，从而改变样本中水分子微观环境，最终可由磁共振检测到T2弛豫时间变化[35]。美国FDA已批准T2 Candida系统用于血液中念珠菌的鉴定，该方法不需要培养，敏感性极高（1~3 CFU/mL），且需时不足3 h[36]。此外，即使样本中存在非靶标核酸、蛋白质和其它生物碎片，T2 Candida系统仍能在高度复杂的背景中实现对微量核酸的高度特异性检测。除了血液标本外，T2 Magnetic Resonance还能够在5 h内检测出皮肤上存在的少量耳念珠菌（< 5 CFU/mL）[37]，提示有望用于多种临床样本中的念珠菌检测。不过，尽管T2 Candida系统在美国已被批准用于念珠菌血症，但在国内仍需进一步研究以建立标准化的检测过程。

3.5 宏基因组学二代测序

基于高通量测序技术发展起来的宏基因组学二代测序技术（metagenomic Next Generation Sequence, mNGS）可以直接对标本中的病原微生物进行检测，具有针对未知、疑难病原微生物检测的快速性、无选择偏性并适用多种检测标本等诸多优势；目前已成功用于脑脊液、血液等标本中少见真菌、危重症真菌感染的检测[38, 39]，显示出敏感、快速的特点；此外mNGS还能够对耐药性念珠菌进行鉴定[40]，对于临床上选择敏感的抗真菌药物开展精准诊疗，具有重要意义。

但是，mNGS用于鉴定念珠菌的研究较少，参考数据和使用标准尚不完善；而且高通量测序数据分析较为困难，并需要结合临床实际，排除病原菌的定植及样本污染；另外，mNGS所需的高成本也限制了其对念珠菌鉴定的临床应用。

3.6 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法（Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS）是一种在蛋白质水平检测核糖体蛋白差异的新型软电离质谱技术，具有简单、快速、准确的特点，已经被广泛用于临床微生物实验室的菌种鉴定。研究表明，MALDI-TOF MS能对98.3%的酵母菌进行准确鉴定，其中常见念珠菌和少见念珠菌的鉴定准确率分别为100%和95.7%，并且能够区分与白念珠菌亲缘性较近的希木龙念珠菌和耳念珠菌[17]。有研究显示，MALDI-TOF MS能够鉴定出耐药的念珠菌，包括多重耐药的耳念珠菌[41, 42]。鉴定念珠菌操作时，只需1~2个单菌落，可省去分离纯化的时间，检测单个样本只需要5-10 min，可显著提高工作效率，故目前有很多临床实验室已经引进了MALDI-TOF MS方法。但是，MALDI-TOF MS鉴定方法仍然存在一定局限性，譬如仍需基于培养阳性，且依赖特定的参考数据库并对数据库进行及时升级和更新等。

4 小结及启示

由于侵袭性真菌病的发病逐年增多而且死亡率高，加上不同种的病原性真菌对于抗真菌药物的敏感性不同以及耐药菌株的不断出现，利用规范的方法对病原性真菌进行快速检测和精确鉴定，对于侵袭性真菌病的早期诊断和精准治疗具有重要意义。从病原性念珠菌检测和鉴定方法的发展来看，开展规范的直接镜检和培养仍是鉴定念珠菌必不可少的部分。在此基础上，开展病原性念珠菌生理、生化代谢及其与宿主互作特性的深入研究，还将为研发鉴定病原性念珠菌的新型生理生化方法和相关的试剂盒提供依据。病原性真菌领域分子生物学理论和技术的充分发展，催生了rDNA扩增和测序、实时定量PCR、mNGS、MALDI-TOF MS等用于检测和鉴定病原性念珠菌的手段，具有快速、敏感、特异的特点，相信这些技术在侵袭性念珠菌病诊断的实践中会提出更新的问题并得到进一步的完善。尤其值得注意的是，T2 Candida系统的问世及其被批准在念珠菌血症临床诊断中应用，显示出病原真菌学与影像学、生物医学工程等专业的高度融合。如何整合不同专业研究成果，开展学科交叉性研究，将

研究成果转化为精准检测和鉴定病原性念珠菌的先进技术并研发出新型设备或手段以达到对侵袭性念珠菌病的精准快速诊断，则是目前念珠菌检测和鉴定研究中应该努力的方向和需要解决的重要问题。

相信经过生物医学领域深入的基础研究，尤其是与临床应用、企业研发和行政管理部门广泛且充分的交流与合作，在不久的将来我国一定能够达到解决临床需求、造福人民健康并促进经济与社会进步的宏伟目标。

参 考 文 献

[1] PAPPAS P G, LIONAKIS M S, ARENDRUP M C, et al. Invasive candidiasis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 18026.

[2] 陈江汉，廖万清. 念珠菌鉴定的研究进展[J]. 国外医学皮肤性病学分册, 1993, 5 (19): 258-261.

[3] 高锦，王中新. 念珠菌鉴定方法的研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册), 2008, 3(29): 109-113.

[4] 王端礼. 医学真菌学实验室检验指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 525.

[5] CAMPANHA N H, NEPPELENBROEK K H, SPOLIDORIO D M P, et al. Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*[J]. Oral Dis, 2005, 11(6): 392-398.

[6] MULET BAYONA J V, SALVADOR GARCíA C, TORMO PALOP N, et al. Evaluation of a novel chromogenic medium for *Candida* spp. identification and comparison with CHROMagar™ Candida for the detection of *Candida auris* in surveillance samples[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2020, 98(4): 115168.

[7] 张秀珍，朱德妹. 临床微生物检验问与答（第2版）[M]. 北京: 人民卫生出版社，2014: 258-262.

[8] BORMAN A M, SZEKELY A, JOHNSON E M. Comparative pathogenicity of United Kingdom isolates of the emerging pathogen *Candida auris* and other key pathogenic *Candida* species[J]. mSphere, 2016, 1(4): e00189-16.

[9] ZHANG H, NIU Y F, TAN J W, et al. Global screening of genomic and transcriptomic factors associated with phenotype differences between multidrug-resistant and -susceptible *Candida haemulonii* strains[J]. mSystems, 2019, 4(6): e00459-19.

[10] SOUZA M N, ORTIZ S O, MELLO M M, et al. Comparison between four usual methods of identification of *Candida* species[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2015, 57(4): 281-287.

[11] MATARE T, NZIRAMASANGA P, GWANZURA L, et al. Experimental germ tube induction in *Candida albicans*: an evaluation of the effect of sodium bicarbonate on morphogenesis and comparison with pooled human serum [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 1976273.

[12] HILMIOGLU S, ILKIT M, BADAK Z. Comparison of 12 liquid media for germ tube production of *Candida albicans* and *C. tropicalis*[J]. Mycoses, 2007, 50(4): 282-285.

[13] KIM D, SHIN W S, LEE K H, et al. Rapid differentiation of *Candida albicans* from other *Candida* species using its unique germ tube formation at 39 degrees C[J]. Yeast, 2002, 19(11): 957-962.

[14] KIM T H, PARK B R, KIM H R, et al. *Candida dubliniensis* screening using the germ tube test in clinical yeast isolates and prevalence of *C. dubliniensis* in Korea[J]. J Clin Lab Anal, 2010, 24(3): 145-148.

[15] GAYIBOVA Ü, DALYAN CıLO B, AĞCA H, et al. Comparison of Phoenix™ Yeast ID Panel and API® ID 32C commercial systems for the identification of *Candida* species isolated from clinical samples[J]. Mikrobiyol Bul, 2014, 48(3): 438-448.

[16] ELLEPOLA A N, KHAN Z U. Rapid differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* by early D-xylose assimilation[J]. Med Princ Pract, 2012, 21(4): 375-378.

[17] ARASTEHFAR A, DANESHNIA F, KORD M, et al. Comparison of 21-Plex PCR and API 20C AUX, MALDI-TOF MS, and rDNA sequencing for a wide range of clinically isolated yeast species: improved identification by combining 21-Plex PCR and API 20C AUX as an alternative strategy for developing countries[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 21.

[18] LIGUORI G, DI ONOFRIO V, LUCARIELLO A, et al. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification[J]. Oral Microbiol Immunol, 2009, 24(1): 76-78.

[19] GALÁN F, GARCÍA-AGUDO L, GUERRERO I, et al. Evaluation of mass spectrometry for the identification of clinically interesting yeasts[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2015, 33(6): 372-378.

[20] PASLIGH J, RADECKE C, FLEISCHHACKER M, et al. Comparison of phenotypic methods for the identification of *Candida dubliniensis*[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2010, 43(2): 147-154.

[21] HUANG Y S, WANG F D, CHEN Y C, et al. High rates

of misidentification of uncommon *Candida* species causing bloodstream infections using conventional phenotypic methods[J]. J Formos Med Assoc, 2021, 120 (5): 1179-1187.

[22] GABALDÓN T. Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS[J]. FEMS Microbiol Rev, 2019, 43(5): 517-547.

[23] IRINYI L, LACKNER M, DE HOOG G S, et al. DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals[J]. Fungal Biol, 2016, 120(2): 125-136.

[24] LU H Z, JIA J H, WANG Q M, et al. *Candida asparagi* sp. nov., *Candida diospyri* sp. nov. and *Candida qinlingensis* sp. nov., novel anamorphic, ascomycetous yeast species[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, 54(Pt 4): 1409-1414.

[25] VU D, GROENEWALD M, SZÖKE S, et al. DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation[J]. Stud Mycol, 2016, 85: 91-105.

[26] SONG Y G, CHEN X L, YAN Y, et al. Prevalence and antifungal susceptibility of pathogenic yeasts in China: a10-year retrospective study in a teaching hospital[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1401.

[27] LIU W, TAN J, SUN J, et al. Invasive candidiasis in intensive care units in China: in vitro antifungal susceptibility in the China-SCAN study[J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(1): 162-167.

[28] LI Y, WAN Z, LIU W, et al. Synergistic activity of chloroquine with fluconazole against fluconazole-resistant isolates of *Candida* species[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(2): 1365-1369.

[29] TAN J W, ZHANG J Q, CHEN W, et al. The A395T mutation in ERG11 gene confers fluconazole resistance in *Candida tropicalis* causing candidemia[J]. Mycopathologia, 2015, 179(3-4): 213-218.

[30] 刘伟，李若瑜，卜定方，等. PCR法扩增角鲨烯环氧化酶鉴定白念珠菌的研究[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2001, 17(3): 150-152.

[31] 李若瑜，李东明，余进，等. 分子生物学技术在病原真菌鉴定和真菌感染诊断中的应用[J]. 北京大学学报(医学版), 2004, 36(5): 536-539.

[32] CLANCY C J, NGUYEN M H. Non-culture diagnostics for invasive candidiasis: promise and unintended consequences[J]. J Fungi (Basel), 2018, 4(1): 27.

[33] HERRERA S, PAVONE P, KUMAR D, et al. Chronic *Candida dubliniensis* meningitis in a lung transplant recipient[J]. Med Mycol Case Rep, 2019, 24: 41-43.

[34] WANG Q, KONTOYIANNIS D P, LI R Y, et al. A novel broad allele-specific TaqMan Real-time PCR method to detect triazole-resistant strains of *Aspergillus fumigatus*, even with a very low percentage of triazole-resistant cells mixed with triazole-susceptible cells[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2019, 57(9): e00604-19.

[35] PFALLER M A, WOLK D M, LOWERY T J. T2MR and T2Candida: novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis[J]. Future Microbiol, 2016, 11(1): 103-117.

[36] KIDD S E, CHEN S C, MEYER W, et al. A new age in molecular diagnostics for invasive fungal disease: are we ready?[J]. Front Microbiol, 2020, 10: 2903.

[37] SEXTON D J, BENTZ M L, WELSH R M, et al. Evaluation of a new T2 Magnetic Resonance assay for rapid detection of emergent fungal pathogen *Candida auris* on clinical skin swab samples[J]. Mycoses, 2018, 61 (10): 786-790.

[38] ZHU Y M, AI J W, XU B, et al. Rapid and precise diagnosis of disseminated *T. marneffei* infection assisted by high-throughput sequencing of multifarious specimens in a HIV-negative patient: a case report[J]. BMC Infect Dis, 2018, 18(1): 379.

[39] WILSON M R, SAMPLE H A, ZORN K C, et al. Clinical metagenomic sequencing for diagnosis of meningitis and encephalitis[J]. N Engl J Med, 2019, 380 (24): 2327-2340.

[40] BISWAS C, MARCELINO V R, VAN HAL S, et al. Whole genome sequencing of Australian *Candida glabrata* isolates reveals genetic diversity and novel sequence types[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 2946.

[41] VATANSHENASSAN M, BOEKHOUT T, MEIS J F, et al. *Candida auris* identification and rapid antifungal susceptibility testing against echinocandins by MALDI-TOF MS[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 20.

[42] VATANSHENASSAN M, BOEKHOUT T, LASS-FLÖRL C, et al. Proof of concept for MBT ASTRA, a rapid Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) -based method to detect caspofungin resistance in *Candida albicans* and *Candida glabrata*[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(9): e00420-18.

［收稿日期］2020−11−29