

• 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.17.028

抗真菌药物敏感性检测新方法的研究进展*

陈燕珊 综述, 芮勇宇[△] 审校

南方医科大学南方医院检验医学科, 广东广州 510515

摘 要: 抗真菌药物敏感性检测的目标是生成可靠的最小抑菌药物浓度, 判断菌株的药物敏感性, 从而指导临床医生的抗真菌治疗, 为流行病学研究和开发新的抗真菌药物提供信息。然而目前的标准化药物敏感性检测方法在许多商品化药物敏感性检测方法存在检测时间长、适用菌株范围不完整的局限性。该文对目前的抗真菌药敏试验新方法进行综述, 包括单细胞水平分析法、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱、等温微量热法及新型的商品化检测系统, 并对它们的优点和不足进行分析, 以期在日益加重的全球真菌感染中为抗真菌药物敏感性检测新方法提供新的研究方向, 实现快速、准确的药物敏感性检测。

关键词: 药物敏感性检测; 抗真菌药物; 耐药; 快速检测; 最小抑菌药物浓度

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2024)17-2602-05

Research progress on new methods for antifungal drug susceptibility testing*

CHEN Yanshan, RUI Yongyu[△]

Department of Medical Laboratory, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China

Abstract: The goal of antifungal sensitivity detection is to generate a reliable minimum concentration of antibacterial drugs, to judge the drug sensitivity of strains, to guide clinicians in antifungal treatment, to provide information for epidemiological research and to develop new antifungal drugs. However, the current standardized drug sensitivity testing methods and many commercial drug sensitivity detection methods have the limitations of long detection time and incomplete range of applicable strains. In this paper, the new methods of antifungal susceptibility test are reviewed, including single cell level analysis, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and isothermal microcalorimetry detection and new commercial detection systems. Their advantages and disadvantages are analyzed to provide a new research direction for new methods of antifungal susceptibility detection in the increasing global fungal infections and to achieve rapid and accurate drug sensitivity detection.

Key words: drug susceptibility testing; antifungal drug; drug resistance; rapid detection; minimum inhibitory drug concentration

近几十年来, 随着真菌感染的危险因素(免疫抑制剂和广谱抗真菌药物的使用、有创性操作)不断增加, 侵袭性真菌感染事件发生率正在逐年上升, 主要的真菌种类也在发生改变^[1-2]; 此外, 新型抗真菌药物的研究迅速发展, 真菌菌株的耐药性也在不断增强^[3-4], 使抗真菌药物敏感性的检测在临床上越来越重要, 如何获取又快又准的药物敏感性数据从而为临床治疗提供指导, 是对抗真菌药敏试验提出的新挑战。抗真菌药物敏感性检测一般在临床实验室进行, 通过确定药物的最小抑菌浓度(MIC)来判断菌株的体外敏感性和耐药性。理想情况下, 通过体外药物敏

感性数据, 可以对抗真菌治疗结果有准确可靠的预测^[5-6]。

目前标准化的体外抗真菌药敏试验主要为美国临床和实验室标准化协会(CLSI)和欧洲抗菌药物敏感性测试委员会(EUCAST)制定的标准方法, 包括肉汤稀释法、纸片扩散法和琼脂筛选法。标准化的目标是最大限度地减少影响因素(包括终点定义、菌液的接种量、培养时间、培养温度和测试介质等)的变异性对最终 MIC 值的影响^[7]。其中, 肉汤微量稀释法是目前临床实验室普遍使用的标准方法, 通过比较含药物和不含药物孔的真菌生长情况来确定 MIC, 判断药

* 基金项目: 广东省自然科学基金项目(2021A1515012249)。

[△] 通信作者, E-mail: ruiyongyu@163.com。

物敏感性^[8-9],但 CLSI 标准使用目视比较,不同实验人员判断结果存在主观差异性,且所需培养时间较长。商业化方法 Sensititre Yeast One(SYO)和 Vitek 2 酵母板原理都是基于肉汤微量稀释法,适用于酵母类真菌的药敏试验,与标准 CLSI、EUCAST 方法保持了良好的一致性^[10-11]。Vitek 2 酵母板是一种自动化检测方法,适用于具有高检测量的临床实验室。但 Sensititre YeastOne 和 Vitek 2 酵母板不适用于丝状真菌的检测。纸片扩散法则是测量含药纸片周围产生的生长抑制区直径,与区域直径标准比较后确定真菌的药物敏感性。区域直径标准来源于区域直径和 MIC 值比较,所以它局限于已知的抗真菌药物和真菌组合,对于新的真菌或者新的药物不适用。商业化梯度扩散条法和纸片扩散法原理相同,能够通过生成 MIC 值量化真菌对药物的敏感性,与肉汤微量稀释法之间能保持良好的一致性,不仅能应用于酵母类真菌检测,也能应用于丝状真菌检测,适用于大部分抗真菌药物检测^[12-13],但同样存在培养时间长的问題。EUCAST 还制定了四孔琼脂筛选板测定曲霉茵的药物敏感性的标准^[14],但这种办法只适用于敏感菌株,在临床应用上有较大的局限性。无论是标准药物敏感性检测方法,还是商品化方法,都存在培养时间长或适用菌株、抗真菌药物范围不全面的局限性,而且对于临床实验室还需要在保证实验结果的准确性上,提高检测通量,满足临床需求。因此,需要对抗真菌药物敏感性检测方法做进一步研究,本文就目前的抗真菌药物敏感性检测的新方法进行综述。

1 单细胞水平分析法

1.1 流式细胞术

流式细胞术是一种现有的分子检测技术,可以用于抗真菌药物敏感性测试。待测真菌的菌悬液用一系列梯度稀释浓度的抗真菌药物处理后,再用荧光染料染色,用流式细胞仪测量真菌细胞的荧光强度。因为药物对真菌的损伤,真菌的活力会发生变化,荧光强度也会发生改变。

流式细胞术主要应用于念珠茵属和隐球茵属的药物敏感性检测,在一些念珠茵属的检测中,流式细胞术的检测结果与肉汤微量稀释法的结果具有良好的一致性^[15]。已有研究通过流式细胞术对丝状真菌的形态分析和活力评估^[16],发现流式细胞术在丝状真菌的药敏试验应用上具有较大的潜力。还有研究结合成像流式细胞仪开发了一种用于真菌细胞学分析的自动图像采集和分析方法,可用于真菌细胞的表型检测,在新抗真菌药物的开发和真菌药敏试验方面也有潜在的应用价值^[17]。此外,虽然流式细胞术可以在几个小时内得到药物敏感性结果,而肉汤微量稀释至少需要 1 d,前者大大缩短了检测需要的时间,但目前的流式细胞术仍需要专业技术水平过硬的技术人员

操作,应用范围存在局限。

1.2 多孔氧化铝(PAO)培养观察法

PAO 是一种蜂窝状的纳米结构材料,由致密的六边形圆孔组成,具有化学稳定性、均匀性、优异的机械强度和生物相容性^[18]。PAO 已经被证实可以应用于真菌的药敏试验中。把待测菌株接种在 PAO 条上,再将 PAO 条放在含一定浓度抗真菌药物的 RPMI 1640 琼脂平板上进行培养,之后单独对 PAO 条进行染色,并在显微镜下分析微菌落,微菌落的面积变化就可以解释为药物对真菌的作用^[19-20]。在 1 项使用 PAO 培养观察法对念珠茵进行快速药敏试验的研究中发现,PAO 培养观察法和肉汤微量稀释法的结果总体一致性为 86.5%,其中检测对两性霉素 B 敏感性的一致性为 88.2%、棘白菌素为 91.2%,三唑类药物的一致性最差(79.4%~82.4%)。新方法在 2 h 内就可以获得药物敏感性结果,大大缩短了检测时间^[19]。后续研究可以通过对数据进行批处理,实现检测的自动化和更快速检测。

1.3 几丁质检测法

目前的主要抗真菌药物唑类、棘白菌素和多烯类都作用于真菌的细胞壁,引起几种应激激活信号通路上调,例如蛋白激酶 C、丝裂原活化蛋白激酶、HOG 信号通路和 Ca^{2+} 级联反应,以抵消细胞壁损伤,导致几丁质合成上调^[21-22]。因此,对细胞壁几丁质的检测可以反映抗真菌药物对真菌的损伤程度。把待测菌株接种于含有连续梯度稀释的棘白菌素或唑类药物培养基中培养一定时间后,再用钙氟白荧光染料对几丁质进行染色,再采用荧光显微镜测定具有高几丁质水平的真菌细胞的百分比,这种检测方法称为 SensiFONG。WANG 等^[23]采用 SensiFONG 法检测了 59 株菌株(白色念珠茵 28 株、光滑念珠茵 17 株和烟曲霉 14 株)的敏感性,对白色念珠茵、光滑念珠茵和烟曲霉药物敏感性检测的灵敏度分别为(87%、93%和 100%),特异度分别为 93%、84%和 82%,SensiFONG 法与 EUCAST 肉汤微量稀释法的检测结果之间的相关性也非常好,且 SensiFONG 法能在混合药物培养 6 h 后获得结果^[23]。SensiFONG 法被认为是一种具有自动读取功能及解释客观的方法,且比传统的测定方法能更快地获得 MIC 值。但是 SensiFONG 法还需要进一步的研究,可通过检测更多的真菌种类和更多的临床分离株,评估 SensiFONG 法的可靠性并调整几丁质阈值,加强该方法的准确性和适用性。

1.4 基于强度反射干涉光谱测量的硅微孔

相移反射干涉光谱测量(PRISM)的基本原理是基于层状相位光栅内的细胞定植和实时收集的微流体中细胞的相移反射干涉测量来监测细胞的生长情况。PRISM 已经被证明可以用于抗菌药敏试验,在硅微孔结构阵

列中定植细菌,用适当的抗菌药物溶液培养细菌,然后实时收集光栅内细菌的相移反射干涉谱来确定抗菌药物敏感性,光栅内细菌正常生长时,光程差增加,细菌生长停止或者抑制时光程差减少^[24]。

对于真菌药敏试验,已有研究建立基于强度反射干涉谱测量的硅微孔结构法(iPRISM)作为真菌药物敏感性检测的新方法,并使用黑霉菌作为模式微生物评估新方法的性能^[25]。iPRISM 依赖于在硅微孔中捕获真菌分生孢子,然后通过基于强度的反射干涉光谱测量实时监测真菌生长。伏立康唑的 iPRISM MIC 值和肉汤微量稀释法的 MIC 值相同,两性霉素 B 的 iPRISM MIC 值高于肉汤微量稀释法 MIC 值,但伏立康唑和两性霉素 B 的 iPRISM MIC 值都符合 EUCAST 的 MIC 分布。iPRISM 所需的时间是 15 h,比常规的肉汤微量稀释法时间明显缩短。iPRISM 的检测原理简单,未来需要更多研究,验证其在真菌药敏试验中的可行性。

1.5 拉曼光谱法 拉曼光谱法的技术原理是拉曼散射效应,通过对散射光谱进行分析获得分子振动和转动等方面的信息,并应用于分子结构研究。受激拉曼光谱(SRS)测量是一种非侵入性技术,SRS 显微镜已被应用于对原位代谢活动进行成像^[26]。已有研究通过使用 SRS 代谢成像对细菌进行快速抗菌敏感性测试^[27]。在这些研究中,氘(D)原子以氧化氘(D₂O)或氘代葡萄糖的形式被掺入生物分子中,并通过细胞代谢转化为细胞、细菌和真菌的碳-氘(C-D)键,然后通过 SRS 成像,分析 C-D 键的振动光谱选择性地探测和量化代谢活性。

CHEN 等^[28]用相似的方法进行了真菌的药敏试验,使用白色念珠菌为模式真菌,并使用 50% D₂O 含量的培养基培养真菌,在真菌中实现高 C-D 信号,毒性研究表明,高达 50% 的 D₂O 浓度不会导致真菌生长的显著变化。通过测量单个真菌的代谢变化在 4 h 内可获得药物敏感性结果。该研究在 8 株白色念珠菌菌株中验证了拉曼光谱对两性霉素 B、氟康唑和米卡芬净药物敏感性检测的可靠性^[28]。此外,还对 2 种白色念珠菌菌株进行了伏立康唑药物敏感性检测,并与肉汤微量稀释法结果进行比较,拉曼光谱法与标准肉汤微量稀释法的 MIC 值相同或没有差异超过两个稀释梯度,药物敏感性分类一致^[28]。

根据拉曼光谱法技术的原理和所需的设备,它具有成本高和劳动密集型成像的特点,进行临床转化有一定难度。首先,它需要使用昂贵的固态激光器进行成像,但拉曼光谱法可以换成光纤光源进行成像来降低成本。其次,在进行高通量药物敏感性检测时,这种方法会产生大数量级的图像数据,通过批处理、对多个样本进行标准化自动处理数据,可以降低数据处

理的难度,加速临床转化。

2 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS 是蛋白质组学和代谢组学的核心技术,目前主要应用于细菌和真菌等微生物病原体的鉴定,具有方便、快速和准确等优点,能大大缩短微生物鉴定的时间^[29]。

MALDI-TOF MS 在抗真菌药物敏感性检测中的应用正在开发中。将待测菌株暴露于抗真菌药物中进行培养后,再进行 MALDI-TOF MS 分析,与无药物对照组比较后,蛋白组学发生的变化就可以被解释为药物对真菌的损伤^[30]。早期的 1 项对白色念珠菌和氟康唑的药物敏感性检测研究发现,通过检测引起待测菌株质谱图明显变化的最低药物浓度(MPCC),可以检测菌株的药物敏感性^[31]。之后陆续有许多将 MALDI-TOF MS 用于真菌(包括念珠菌属和曲霉菌属)药敏试验的研究,与 CLSI 标准方法的结果具有 90% 以上的分类一致性^[32],但可重复性不稳定,需要进一步完善方法并提高可重复性。MALDI-TOF MS 对检测仪器有较高要求,不适合条件有限的实验室,但是对于配备有质谱分析仪器的实验室,应用 MALDI-TOF MS 能明显减少药敏试验的时间,为临床治疗争取更多时间。

3 等温微量热法

等温微量热法是一种测量微生物代谢相关的精确产热量的方法,把产热量和微生物生长的变化相结合^[33]。应用等温微量热法进行真菌药敏试验时,将含有待测真菌的菌悬液、生长培养基和连续梯度稀释的抗真菌药物的培养瓶放置在等温微量热测量仪器内,计算将不含药物的生长对照孔产生的总热量抑制到一定程度的最低药物浓度,称为最小热抑制浓度(MHIC)。在 1 项实时检测曲霉菌属抗真菌药物敏感性的研究中,比较 MHIC 与 CLSI M38 测定的 MIC 的一致性,两性霉素 B 为 90%,伏立康唑为 100%,泊沙康唑为 90%,卡泊芬净为 70%,总体保持了良好的一致性^[34]。

热量已经是化学领域常见的 1 项测量指标,而在生物医学领域,理论上,将热量测量和孔板结合,再通过研究建立起孔间的自动算法来判定 MHIC,从而确定菌株的药物敏感性,就可以实现高通量、实时、快速和自动化的药物敏感性检测,这将是未来等温微量热法的研究方向。

4 快速自动化抗真菌药敏试验系统 Droplet 48

Droplet 48 的原理是荧光染色法,与 SYO 原理相似,它使用刃天青作为氧化还原指示剂来检测荧光强度,使用微流体技术加样,用反射荧光检测装置连续监测荧光强度的变化,反馈真菌的生长,实时报告结

果。有研究采用 SYO 系统作为标准法进行对比分析,除检测泊沙康唑药物敏感性(86.2%)外,伊曲康唑、伏立康唑、两性霉素 B 和卡泊芬净的结果总体一致性均大于 90%;除伏立康唑(87.9%)外,氟康唑、卡泊芬净、米卡芬净和阿尼芬净的结果分类一致性均大于 90%^[35]。这表明 Droplet 48 试验性能与 SYO 系统高度一致,是具有潜力的商业化、自动化真菌药物敏感性检测系统。

Droplet 48 结合了微流控等技术,实现了小样本量、自动加样检测;增加了更多药物的浓度梯度,实现了 96 种不同药物浓度的同时检测,扩大了检测通量;还避免了通过目视读取 MIC 来解释结果的主观性,更适合临床实验室的应用。

5 总结和展望

临床实验室的真菌药敏试验并不像细菌药敏试验一样普及,主要原因包括以下几点。第一,目前临床可用的抗真菌药物有限,常常是经验性治疗。第二,目前临床实验室使用的真菌药物敏感性检测方法需要的时间较长,抗真菌治疗的时机对临床治疗的预后影响很大,可能会出现来不及做药敏试验的情况。此外,对于临床实验室来说,除了考虑测试方法的准确性、便捷性,还要考虑体外药敏试验的数据解释,尤其是与临床治疗之间的关系。MIC 值是体外药敏试验的数据,要求 MIC 值可以用于预测临床治疗结果,当缺乏相应菌属和抗真菌药物组合的临床断点,甚至无法解释 MIC 值时,需要考虑进行药敏试验的可靠性和必要性。

目前,抗真菌药物敏感性检测方法的研究主要集中在减少检测时间,降低检测成本和提高检测通量这几个方面,将微流体芯片、自动化技术和药物敏感性检测方法结合可以达到缩短检测周期和高通量的目的。随着新型抗真菌药物的研究和真菌耐药性的增加,还需要建立完善真菌耐药性监测的计划,建立不同菌株类型的标准化药物敏感性检测方法,提高检测方法的重复性,保证检测结果的准确性和可解释性。为了满足患者、临床医生和临床实验室不断增长的需求,必须进一步研究抗真菌药物敏感性检测的新方法。

参考文献

- [1] ENOCH D A, YANG H, ALIYU S H, et al. The Changing epidemiology of invasive fungal infections[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1508: 17-65.
- [2] 彭雅琴, 廖康, 伍众文, 等. 广东省 2019—2021 年血培养分离真菌的菌种分布及药敏分析[J]. *中国热带医学*, 2023, 23(3): 277-282.
- [3] STEWART A G, PATERSON D L. How urgent is the

need for new antifungals[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2021, 22(14): 1857-1870.

- [4] SONG Y, CHEN X, YAN Y, et al. Prevalence and antifungal susceptibility of pathogenic yeasts in China: a 10-year retrospective study in a teaching hospital[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1401.
- [5] BASSETTI M, VENA A, BOUZA E, et al. Antifungal susceptibility testing in *Candida*, *Aspergillus* and *Cryptococcus* infections: are the MICs useful for clinicians[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2020, 26(8): 1024-1033.
- [6] CHASTAIN D B, WHITE B P, TU P J, et al. Candidemia in adult patients in the ICU: a reappraisal of susceptibility testing and antifungal therapy[J]. *Ann Pharmacother*, 2023: 296936481.
- [7] VAHEDI-SHAHANDASHTI R, STUBENBÖCK M M, LASS-FLÖRL C. The influence of medium composition on EUCAST and etest antifungal susceptibility testing[J]. *J Fungi (Basel)*, 2023, 9(10): 973.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: M27-A4[S]. 4th Edition. Wayne, PA, USA: CLSI, 2017.
- [9] DE-SOUZA-SILVA C M, GUILHELMELLI F, ZAMIT-HMIRANDA D, et al. Broth microdilution in vitro screening: an easy and fast method to detect new antifungal compounds[J]. *J Vis Exp*, 2018, 132: 57127.
- [10] HALLIDAY C L, WEEKS K, FARAC K, et al. Evaluation of a custom Sensititre Yeast One plate for susceptibility testing of isavuconazole and other antifungals against clinically relevant yeast and mould species in three Australian diagnostic mycology laboratories[J]. *Pathology*, 2022, 54(7): 922-927.
- [11] DALYAN C B, ENER B. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) microdilution method and VITEK 2 automated antifungal susceptibility system for the determination of antifungal susceptibility of *Candida* Species[J]. *Cureus*, 2021, 13(12): e20220.
- [12] VIDAL P, SCHWARZ P, DANNAOUI E. Evaluation of the gradient concentration strip method for antifungal susceptibility testing of isavuconazole and comparators for *Mucorales* species[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(10): e00838-19.
- [13] BIDAUD A L, MORENO-SABATER A, NORMAND A C, et al. Evaluation of gradient concentration strips for detection of terbinafine resistance in *Trichophyton* spp[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2023, 67(6): e0171622.
- [14] GUINEA J, VERWEIJ P E, MELETIADIS J, et al. How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E. Def 10. 1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four-well azole-containing agar plates[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25(6):

- 681-687.
- [15] MORALES B P, JUNIOR I N, TRILLES L, et al. Determination of the minimum inhibitory concentration of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* against fluconazole by flow cytometry[J]. *Med Mycol*, 2014, 52 (1): 90-98.
- [16] VEITER L, HERWIG C. The filamentous fungus *penicillium chrysogenum* analysed via flow cytometry-a fast and statistically sound insight into morphology and viability [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103 (16): 6725-6735.
- [17] MCMAHON C L, ESQUEDA M, YU J J, et al. Development of an imaging flow cytometry method for fungal cytological profiling and its potential application in antifungal drug development[J]. *J Fungi (Basel)*, 2023, 9 (7): 722.
- [18] BRAGAZZI N L, GASPARINI R, AMICIZIA D, et al. Porous alumina as a promising biomaterial for public health[J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2015, 101: 213-229.
- [19] INGHAM C J, SCHNEEBERGER P M. Microcolony imaging of *Aspergillus fumigatus* treated with echinocandins reveals both fungistatic and fungicidal activities[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35478.
- [20] INGHAM C J, BOONSTRA S, LEVELS S, et al. Rapid susceptibility testing and microcolony analysis of *Candida* spp. cultured and imaged on porous aluminum oxide[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33818.
- [21] JUNG K W, BAHN Y S. The stress-activated signaling (SAS) pathways of a human fungal pathogen, *cryptococcus neoformans*[J]. *Mycobiology*, 2009, 37(3): 161-170.
- [22] WALKER L A, GOW N A, MUNRO C A. Fungal echinocandin resistance[J]. *Fungal Genet Biol*, 2010, 47(2): 117-126.
- [23] WANG Y, ANDRIAMPAMONJY A N, BAILLY S, et al. New antifungal susceptibility test based on chitin detection by image cytometry[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 64(1): E01101-19.
- [24] LEONARD H, HALACHMI S, BEN-DOV N, et al. Unraveling antimicrobial susceptibility of bacterial networks on micropillar architectures using intrinsic phase-shift spectroscopy[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(6): 6167-6177.
- [25] HEUER C, LEONARD H, NITZAN N, et al. Antifungal susceptibility testing of *aspergillus niger* on silicon microwells by intensity-based reflectometric interference spectroscopy[J]. *ACS Infect Dis*, 2020, 6 (10): 2560-2566.
- [26] CHENG J, XIE X S. Vibrational spectroscopic imaging of living systems: an emerging platform for biology and medicine[J]. *Science*, 2015, 350(6264): aaa8870.
- [27] ZHANG M, HONG W, ABUTALEB N S, et al. Rapid determination of antimicrobial susceptibility by stimulated raman scattering imaging of d_2o metabolic incorporation in a single bacterium[J]. *Advanced Science*, 2020, 7 (19): 2001452.
- [28] CHEN C, WANG Y, WU F, et al. Rapid antifungal susceptibility testing based on single-cell metabolism analysis using stimulated raman scattering imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(42): 15556-15565.
- [29] TSUCHIDA S, UMEMURA H, NAKAYAMA T. Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology[J]. *Molecules*, 2020, 25 (20): 4775.
- [30] SANGUINETTI M, POSTERARO B. Mass spectrometry applications in microbiology beyond microbe identification: progress and potential [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2016, 13(10): 965-977.
- [31] MARINACH C, ALANIO A, PALOUS M, et al. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole [J]. *Proteomics*, 2009, 9(20): 4627-4631.
- [32] GIORDANO A, PONTES L, BERAQUET C, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry azole susceptibility assessment in *Candida* and *Aspergillus* species[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2023, 118: e220213.
- [33] BRAISSANT O, BACHMANN A, BONKAT G. Microcalorimetric assays for measuring cell growth and metabolic activity: methodology and applications[J]. *Methods*, 2015, 76: 27-34.
- [34] FURUSTRAND T U, CLAUSS M, HAUSER P M, et al. Isothermal microcalorimetry: a novel method for real-time determination of antifungal susceptibility of *Aspergillus* species [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18 (7): E241-E245.
- [35] YU J, HE C, WANG T, et al. Rapid automated antifungal susceptibility testing system for yeasts based on growth characteristics[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1153544.