

• 综 述 •

临床病原真菌的诊断技术进展*

陶成龙¹, 陈伊巧², 刘 傲², 杨必文², 苏成康¹, 叶丙刚³, 郭周义²综述, 刘智明^{2△}审校

1. 广州浩康生物科技有限公司, 广东广州 510660; 2. 华南师范大学生物光子学研究院国家

中医药管理局中医药与光子技术三级实验室, 广东广州 510631

3. 广东食品药品职业学院软件学院, 广东广州 510520

摘 要:临床病原真菌的诊断一直是临床检验中的一项难题, 由于其独特的细胞结构, 并且早期感染无明显症状, 导致了其在检验诊断中产生了一定的困难。近年来, 真菌感染所导致的疾病死亡率逐渐上升, 如何对病原真菌进行快速检测对病原真菌的治疗有着重要意义。该文总结了传统技术以及一些新技术在病原真菌诊断上的应用, 并对真菌诊断如何与其他学科共同交叉发展提出了展望。

关键词:真菌; 快速检测; 荧光染色; 分子诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.17.022

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2021)17-2146-05

文献标志码:A

Advances in diagnostic techniques of clinical pathogenic fungi*TAO Chenglong¹, CHEN Yiqiao², LIU Ao², YANG Biwen²,SU Chengkang¹, YE Binggang³, GUO Zhouyi², LIU Zhiming^{2△}

1. Guangzhou Haokang Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510660, China;

2. SATCM Third Grade Laboratory of Chinese Medicine and Photonics Technology, College of Biophotonics, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China; 3. Software College, Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou, Guangdong 510520, China

Abstract: The diagnosis of clinical pathogenic fungi has always been a difficult problem in clinical testing. Due to its unique cell structure and no obvious symptoms of early infection, it is difficult to detect and diagnose the fungi. In recent years, the mortality rate of diseases caused by fungal infection is increasing gradually. How to conduct rapid detection of pathogenic fungi is of great significance for the treatment of pathogenic fungi. This paper summarizes the application of traditional techniques and some new techniques in the diagnosis of pathogenic fungi, and puts forward the prospect of the development of fungal diagnosis and other disciplines.

Key words: fungi; rapid detection; fluorescence staining; molecular diagnosis

临床微生物从广义上可分为三类, 即细菌、真菌与病毒。真菌, 属于真菌界, 与动物界、植物界、原核生物界以及原生生物界并行。与细菌不同, 真菌是真核微生物, 有明显的细胞核和完整的细胞器。真菌广泛的分布在自然界中, 当人体免疫力下降或者受损时, 容易遭到真菌侵袭, 引起真菌病。据统计, 近年来由于糖皮质激素、广谱抗菌药物的滥用, 耐药真菌不断出现。如在之前的资料中有报道, 美国出现了抗药性强的“超级真菌”耳道念珠菌^[1], 这些抗性真菌的出现使得真菌诊断治疗更加困难。

目前, 临床常用的检测方法为镜检法、培养法与组织病理法。但这些方法均与检验医师的专业水平息息相关。自然界中大多数细菌生长速度较快, 而真

菌与细菌不同, 生长速度往往较慢, 生长条件更为苛刻, 其结构也更为复杂, 没有特异性的临床表现, 极易造成漏诊误诊, 传统的金标准培养法耗时过久。因此建立快速诊断病原真菌的方法极有必要。本文针对临床微生物中真菌感染的检测诊断手段以及诊断现有技术进行介绍。

1 形态学检测法

真菌有明显的形态特征, 如孢子、菌丝。采用形态学观察法可初步对样本进行预判, 由此诞生了镜检法。在浅部真菌的诊断中, 湿片法[氢氧化钾(KOH)法], 即取病变的皮屑部位, 通过 10% 的氢氧化钾加热后直接镜检, 观察到真菌组织后, 即可诊断为真菌感染。传统的培养法将样本进行适当处理后接种于合

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(32071399、61675072); 广东省省级科技计划项目(2017A020215059); 广东食品药品职业学院自然科学重点项目(2019ZR01、2020ZR01)。

△ 通信作者, E-mail: liuzm@sclu.edu.cn。

本文引用格式: 陶成龙, 陈伊巧, 刘傲, 等. 临床病原真菌的诊断技术进展[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(17): 2146-2150.

适的培养基,适宜温度培养,观察菌落特征、菌丝以及孢子的特征继续鉴定。虽然培养法一直作为真菌诊断的金标准,但事实上其耗时过长,无论是浅部真菌感染还是深部真菌感染,诊断速度都非常重要。

现有技术结合不同种类的染料对传统的镜检法进行了不断升级与延伸。荧光增白剂法,如 Blankophor 和 Calcofluor white,其可以与真菌中的壳多糖和纤维素特异性结合,在荧光显微镜下,真菌孢子及菌丝发出黄绿色或淡蓝色荧光,与暗背景形成鲜明对比。与湿片法相比,该法检测皮肤和指甲样品中的真菌成分更快^[2]。CARD 等^[3]通过研究荧光素对植物内生菌丝的染色发现,5-氯甲基荧光素二乙酸酯(CM-FDA)对真菌菌丝的染色强度最大,且受光漂白的影响也最小。现在市面上已经有成熟的商业化检测试剂。罗云鹏等^[4]对比了特敏增强荧光染色液、钙荧光白(Calcofluor white)、湿片法(KOH)3种染色方法,特敏增强荧光染色法检出率高于钙荧光白染色法和湿片法($\chi^2 = 17.984, P < 0.05; \chi^2 = 32.063, P < 0.05$),试验结果证明了该方法简单、速度较快。但荧光染色法中荧光染料的稳定性、淬灭度、生物相容性仍然需要解决。

2 血清学检测法

血清学检测主要包括抗原、代谢产物和抗体检测^[5]。

2.1 抗原与代谢产物检测技术

2.1.1 G 试验与 GM 试验 β -1,3-D-葡聚糖(BDG)广泛存在于真菌细胞壁中,可占其干质量的 50% 以上。在没有内毒素的情况下,其可激活鲎试剂变形细胞裂解液中的 G 因子,产生凝集反应。基于此反应原理的 G 试验可以特异性检测 BDG^[6]。GM 是曲霉菌的特异性抗原,曲霉菌菌丝生长时,GM 从薄弱的菌丝顶端释放,是感染过程中最早释放的抗原。GM 的释放量可以反映感染程度,所以可以作为疗效的评价指标。但是当大剂量使用激素时,GM 试验可能出现假阳性^[7]。也有研究表明,G 试验和 GM 试验联合检测可更有效诊断侵袭性曲霉病^[8]。

2.1.2 隐球菌荚膜多糖抗原检测 隐球菌感染后,体内可形成大量荚膜多糖,释放到血液和脑脊液中。乳胶凝集试验是检测隐球菌荚膜抗原最有价值的快速血清学方法之一,可快速、准确地检测脑脊液或血液中的多糖抗原,其灵敏度高于传统的印度墨汁染色和菌培养^[9]。现有的隐球菌抗原检测商品化试剂盒采用多克隆抗体捕获抗原,再用单克隆抗体进行检测,可同时提高灵敏度和特异度。此外,通过对荚膜多糖抗原的定量检测可用于对患者的疗效评价,但在免疫功能低下患者中应用时应结合其他检测结果进行解释^[10]。

2.2 抗体检测技术 以往的研究普遍认为抗体检测的特异性较差,不能区分是体内定植还是感染,而机

会性真菌感染常发生在机体免疫功能低下的人群,难以产生足够量的抗体,易发生假阴性^[11]。目前,已有对白念珠菌、曲霉菌的抗体检测方法^[12],真菌特异性抗体检测已经成为检测真菌病的一种重要方法。一项纳入血液肿瘤和危重患者的系统性回顾研究显示,甘露聚糖抗原/甘露聚糖抗体联合检测优于其单独检测,灵敏度和特异度分别达 83% 和 86%^[13]。2016 年更新的美国感染病学会(IDSA)曲霉病诊断与处置指南中,强烈推荐血清和 BALF GM 试验用于血液病患者侵袭性曲霉病的检测^[14]。

3 分子生物学诊断方法

近年来,由于分子生物学的迅速发展与崛起,越来越多的分子生物学手段应用于病原体检测中^[15]。其方法准确,速度较快、特异性高、灵敏性强,且不需要临床经验^[16]。针对核酸的基因检测系列方法可以避免镜检法所受的形态学限制,并且可实现精准的菌种鉴定甚至是定量分析。但真菌的细胞壁较为坚硬,需要良好的前处理方法进行细胞壁的破碎,涉及皮肤样本的处理,减少干扰。现在已有的分子生物学手段大致为以下几种。

3.1 常规 PCR 技术及其衍生技术 由于细菌或真菌在基因水平上都有特异的靶基因,采用设计好的通用引物,通过 PCR 技术扩增特异的靶基因可以实现种类的判定。引物的选择和设计是采用 PCR 技术检测病原体的首要关键。rRNA 常用于设计通用引物,与 rRNA 的 18S、28S、5.8S rRNA 基因组序列相比较,内转录间隔区(ITS)作为非编码区具有更高选择性,并且能够提供详尽的系统学分析所需要的可遗传性状,因此最常用来进行引物设计^[17]。在系统发育的研究上,PCR 技术也被用来进行分析,这也为真菌的特异性诊断提供了基础。在常规 PCR 的基础上,衍生了荧光定量 PCR、环介导等温扩增(LAMP)等技术。

3.1.1 荧光定量 PCR 荧光定量 PCR 也常称作 qPCR,其是一种在 DNA 扩增反应中,以荧光化学物质测每次聚合酶链式反应(PCR)循环后产物总量的方法。随着扩增循环的进行,qPCR 仪器以图形方式实时显示输出。输出通常通过荧光来检测,这可以简单到测量双链产物的量,或者向反应中加入对扩增子内靶序列特异的探针,可以使用多个探针来产生多重反应。现有方法将多重 PCR 与荧光定量 PCR 结合,发展为多重荧光定量 PCR。将针对部分病原体 16S rRNA 和 rpoB 基因序列的 PCR 与使用 SYBR Green qPCR 的单次运行程序中的组合 ITS/LSU 序列与 Sanger 测序相结合,该方法成为仅在 2 d 内鉴定细菌和真菌的合适工具^[18]。但荧光定量 PCR 所需要的仪器与相关试剂价格都相对昂贵^[19]。

3.1.2 等温扩增技术 常规 PCR 需要经过变性、退火、延伸 3 个变温步骤。与常规 PCR 技术不同,

LAMP 是一种等温 PCR 技术,在 60~65 °C 下进行,可以利用聚合酶在合成新链时置换其中一条 DNA 链,达到扩增核酸的目的。LAMP 使用 4 个引物而不是通常的 2 个,这提供了比典型引物更大的特异性,尽管引物设计更具挑战性^[20]。LAMP 已经应用于许多主要的真菌病原体鉴定^[21]。用于真菌鉴定的第二种等温扩增方法称为基于核酸序列的扩增(NASBA),它使用核糖核酸作为模板。这种反应通常在 41 °C 下进行,目标 RNA 可以以数千份的形式存在。在侵袭性曲霉病的研究中,ZHAO 等^[22]发现,NASBA 与美国食品和药物管理局(FDA)批准的血清学鉴定法有很好的相关性。用于真菌鉴定的第三种等温扩增方法是滚环扩增(RCA)。RCA 使用病毒聚合酶以圆形模板的形式扩增靶序列。这种方法的主要优点是,它可以将靶扩增到超过 10^9 个拷贝,几乎不需要优化,并且耐污染,而这是其他 PCR 的主要缺陷^[23]。RCA 已经成功地应用于毛霉菌^[24]、隐球菌^[25]的检测中。

3.2 核酸杂交技术 核酸杂交技术是利用核酸探针来检测 DNA 或 RNA 的特定基因序列。包括 Northern 杂交、Southern 杂交、荧光原位杂交、基因芯片技术等等^[26]。目前已经衍生出了可用于检测念珠菌与曲霉菌的荧光原位杂交(FISH)技术,相比传统的核酸杂交技术,其稳定性更好。FISH 以 rDNA 序列为检测目标^[27]。该方法对标本的前处理要求低,规避了样品准备瓶颈,有助于快速检测周转时间。该分析的变体包括肽核酸 FISH,它利用肽核酸作为探针,由于骨架电荷为中性,所以结合得更牢固,反应更灵敏。由于这种检测方法速度快,可以直接在血液等临床标本上进行,并且只需要很少的样品制备,因此它已经用于念珠菌的检测多年了。市场上有 2 种 FDA 批准的 PNA-FISH 产品^[28]。多年来已经开发了多种基于阵列的杂交策略,并且通常通过使用 PCR 扩增子作为靶阵列的杂交探针来工作。这些方法的一个优点是,目标可以像单个物种特异性寡核苷酸一样简单,同时也允许一次鉴定大量的样本。

4 生物传感器方法

生物传感器的核心成分是通过物理或化学方法固定在电极表面的生物识别元件。目前在细菌与真菌的检测中均有应用,生物传感器大致分类可为以下三类:电化学生物传感器、核酸生物传感器、光学生物传感器。

4.1 电化学生物传感器 电化学生物传感器的核心成分是通过物理或化学方法固定在电极表面的生物识别元件。生物传感器的特定识别功能,可以选择性地识别目标分子并将其捕获到电极表面,信号转换为电流、电压和电阻等可进行测量和分析得参数,从而实现分析目标的定性或定量分析。有学者研制了一种用于检测病原真菌红色毛癣菌抗原的电流型酶免

疫传感器^[29]。

4.2 核酸与蛋白生物传感器 核酸与蛋白生物传感器,即利用核酸或蛋白作为识别元件,常用的如适配体。适配体是通过指数富集系统进化技术(SELEX)体外筛选所获得的小分子的物质,如寡核苷酸序列、蛋白等。核酸检测生物传感器适用于各种各样的基因检测,既能用于遗传性疾病基因缺失突变检测,也能进行疾病和药物易感基因检测。此外,已有研究应用多肽来检测常见的病原真菌白色假丝酵母^[30-32]。

4.3 光学生物传感器 光学生物传感器是利用生物发光、化学发光来检测病原体是一种光学生物传感器方法,生物发光是指机体内的物质在酶的作用下将化学能转化为光能,其中 ATP 生物发光应用广泛且灵敏度高。化学发光是指物质分子在化学反应过程中产生光辐射的现象,这种现象避免了光的干扰。表面等离子体共振、光纤和激光也常用来检测病原体。

4.3.1 拉曼光谱技术 拉曼光谱是一种散射光谱,拉曼散射中的能量的变化表征了分子和化学键的特征,体现了物质的结构特征,其具体表现形式就是拉曼位移。因而人们把拉曼光谱称为物质的“指纹”。蛋白质、糖类、核酸等大分子都可以产生这种特异性指纹,这就为病原的检测提供了可行的理论基础^[33]。

表面增强拉曼光谱技术是将物质分子吸附在基底或纳米材料表面,能够放大若干倍正常的信号强度,使得前菌培养的程序简化,并且可以有效地缩短检测时间,实现单分子检测。鉴于真菌独特的细胞壁结构,表面增强拉曼光谱在检测真菌的研究上有着广阔的前景,有研究用脱氧核糖核酸功能化的银羟胺纳米粒子来检测白色念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌和烟曲霉的感染,利用主成分分析,可以检测每个目标的个体存在,并相应地对它们进行分组^[34-35]。寻找性能好、价格适宜的基底材料是研究的重点,并且仪器的便携性也需要考虑。

4.3.2 傅里叶变换红外光谱(FT-IR)技术 FT-IR 是将红外光谱和计算机技术相结合的分析方法,红外光谱的强度 $h(\delta)$ 与形成该光的两束相干光的光程差 δ 之间有傅里叶变换的函数关系,干涉图上每个频率解释为相应的光强,红外光谱图不同的特征,表示这未知物化学结构、物质的纯度等,可用于临床真菌的检测。有研究取 50 例浅表真菌感染患者的样品使用 FT-IR 显微光谱进行研究。同一物种的光谱是相同的,而不同物种的光谱没有显示出相似性。这项研究表明,FT-IR 可用于获得念珠菌和皮肤真菌物种的“分子指纹”^[36]。但该光谱对于样品的前处理要求比较高,水分子有较强的红外吸收,为避免对其他光谱特征的干扰,需要合理地干燥样品。

4.3.3 荧光适配体技术 适配体目前已经被广泛应用于构建光学生物传感器。荧光适配体主要是用荧光基团标记配体,待检测物与适配体作用后产生荧光

偏振。Luminex 公司的核心技术 xMAP 是用不同配比的不同种荧光染料将直径为 5.6 μm 或 6.5 μm 的聚苯乙烯微球染成不同的荧光色,以此获得不同种类的荧光编码微球。针对不同待测物质的抗体分子或基因探针用共价交联的方式结合到待定的编码微球上,使其均有对应的检测项目。根据待测物质与对应荧光球的混合形成复合物,复合物与标记的荧光素反应,在红绿激光的作用下,进行识别与判定^[37]。FA-ROOQI 等^[38]将 xMAP 技术成功地用于鉴定念珠菌属中的单个真菌菌种。此外,还有纳米材料修饰等方法。荧光基因标记适配体存在着荧光激发、淬灭等相关问题。

5 展 望

5.1 与人工智能结合 与人工智能技术相结合是世界科技发展的主流趋势。人工智能技术目前应用的范围较广,近年来越来越多地被应用于医学研究与临床系统。有学者利用深度学习的方法与拉曼光谱检测法相结合,生成了一个广泛的病原体拉曼图谱数据库,即使在低信噪比谱上,也能达到平均分离水平超过 82% 的准确率和(97.0 $\pm$ 0.3)% 的抗菌药物治疗识别准确率^[39]。有学者将显微镜观察与人工智能技术相结合,采用数字处理、模式识别来获得真菌特征,采用人工神经网络系统从排泄物中识别出真菌^[40]。目前市场上已有该类型的产品。人工智能技术还可以与光学的检测手段进行很好结合,这也为真菌快检与人工智能相结合提供基础。

5.2 新材料的结合 新材料的发展在检验科学的领域也起到了重要作用,纳米材料有良好的光学性能与电学性能,在生物传感器的制作上可以起到改善稳定性的作用。如金属纳米材料,其比表面积大且有良好的生物相容性,在信号响应上有放大的效果,常被用来制备适配体。且纳米材料的溶液颜色与粒子直径大小相关,这一颜色变化可以很好地应用在检测领域中。例如,结合凝集素的纳米材料量子点可用作碳水化合物表达分析的纳米探针,它可提供与癌症和微生物致病性相关的糖基化变化信息,已经应用于白色念珠菌细胞的荧光标记^[41]。纳米材料性能虽然较好,但存在制备效率、生物毒性评价、价格昂贵等问题。

6 小 结

本文介绍了临床及市场上病原真菌的检测方法,目前临床常见与常用的仍是湿片法及结合荧光染色的镜检法、培养法等。目前有越来越多的检测方法用于真菌病的诊断,但技术的可行性距离实际的市场应用仍有很大距离,进入市场应用要考虑经济性和实用性。目前真菌病的特异性检测仍主要依赖于分子生物学的诊断方法,对设备与检验人员的技术要求均较高。通过交叉学科的方法提高特异度、灵敏度、检测速度将会一直是病原真菌快速检测的主要研究内容。

参考文献

- [1] 廖万清,张超,潘炜华.警惕“超级真菌”感染在中国的出现[J].中国真菌学杂志,2017,12(1):1-2.
- [2] OVREN E,BERGLUND L,NORDLIND K,et al. Dermatophytosis:fluorostaining enhances speed and sensitivity in direct microscopy of skin,nail and hair specimens from dermatology outpatients[J].Mycoses,2016,59(7):436-441.
- [3] CARD S D,TAPPER B A,LLOYD-WEST C,et al. Assessment of fluorescein-based fluorescent dyes for tracing Neotyphodium endophytes in planta[J].Mycologia,2013,105(1):221-229.
- [4] 罗云鹏,高仰敏,金云,等.特敏增强荧光染色法在浅部真菌病诊断中的应用[J].临床检验杂志,2017,35(12):736-738.
- [5] 敖家富,张秀芳,孙瑞,等.血清(1,3)- β -D-葡聚糖检测在老年慢性阻塞性肺炎真菌感染中的临床应用[J].国际检验医学杂志,2019,40(11):1382-1384.
- [6] STEVENS D A. Diagnosis of fungal infections: current status[J].J Antimicrob Chemother,2002,49(1):11-19.
- [7] PEMAN J,ZARAGOZA R. Combined use of nonculture-based lab techniques in the diagnosis and management of critically ill patients with invasive fungal infections[J].Expert Rev Anti Infect Ther,2012,10(11):1321-1330.
- [8] FONTANA C. (1-3)- β -D-glucan vs galactomannan antigen in diagnosing invasive fungal infections (IFIs)[J].Open Microbiol J,2012,6(1):70-73.
- [9] HEVEY M A,GEORGE I A,RAUSEO A M,et al. Performance of the lateral flow assay and the latex agglutination serum cryptococcal antigen test in cryptococcal disease in patients with and without HIV[J].J Clin Microbiol,2020,58(11):1563-1570.
- [10] MEYA D B,MANABE Y C,CASTELNUOVO B,et al. Cost-effectiveness of serum cryptococcal antigen screening to prevent deaths among HIV-infected persons with a CD4⁺ cell count < or = 100 cells/mL who start HIV therapy in resource-limited settings[J].Clin Infect Dis,2010,51(4):448-455.
- [11] STEVENS D A,ZHANG Y,FINKELMAN M A,et al. Cerebrospinal fluid (1,3)-beta-D-glucan testing is useful in diagnosis of coccidioidal meningitis[J].J Clin Microbiol,2016,54(11):2707-2710.
- [12] TROVATO L,ASTUTO M,CASTIGLIONE G,et al. Diagnostic surveillance by Candida albicans germ tube antibody in intensive care unit patients[J].J Microbiol Immunol Infect,2020,53(5):778-784.
- [13] MIKULSKA M,CALANDRA T,SANGUINETTI M,et al. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia[J].Crit Care,2010,14(6):125-140.
- [14] PATTERSON T F,THOMPSON G R,DENNING D W,et al. Practice guidelines for the diagnosis and manage-

- ment of Aspergillosis; 2016 update by the Infectious Diseases Society of America[J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 63(4): 1-60.
- [15] NENOFF P, VERMA S B, VASANI R, et al. The current Indian epidemic of superficial dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*: a molecular study[J]. *Mycoses*, 2019, 62(4): 336-356.
- [16] 王月华, 胡珊, 杨英. 病原真菌的检测技术进展[J]. *生物技术通讯*, 2020, 31(2): 117-128.
- [17] TEDERSOO L, ANSLAN S, BAHRAM M, et al. Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi[J]. *MycKeys*, 2015, 2(10): 1-43.
- [18] STING R, EISENBERG T, HRUBENJA M. Rapid and reasonable molecular identification of bacteria and fungi in microbiological diagnostics using rapid real-time PCR and Sanger sequencing[J]. *J Microbiol Methods*, 2019, 159(11): 148-156.
- [19] GABALDON T. Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2019, 43(5): 517-547.
- [20] WICKES B L, WIEDERHOLD N P. Molecular diagnostics in medical mycology[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 5135.
- [21] NOGUCHI H, IWASE T, OMAGARI D, et al. Rapid detection of *Candida albicans* in oral exfoliative cytology samples by loop-mediated isothermal amplification[J]. *J Oral Sci*, 2017, 59(4): 541-547.
- [22] ZHAO Y, PADERU P, RAILKAR R, et al. Blood Aspergillus RNA is a promising alternative biomarker for invasive aspergillosis[J]. *Med mycol*, 2016, 54(8): 801-807.
- [23] FAKRUDDIN M, MANNAN K S, CHOWDHURY A, et al. Nucleic acid amplification: alternative methods of polymerase chain reaction[J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2013, 5(4): 245-252.
- [24] DOLATABADI S, NAJAFZADEH M J, DE HOOG G S. Rapid screening for human-pathogenic *Mucorales* using rolling circle amplification[J]. *Mycoses*, 2014, 57 Suppl 3(2): S67-S72.
- [25] TRILLES L, WANG B, FIRACATIVE C, et al. Identification of the major molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* by Hyperbranched rolling circle amplification[J]. *PloS one*, 2014, 9(4): e94648.
- [26] ZHAO X H, ZHAO F H, WANG J, et al. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives[J]. *RSC Adv*, 2017, 7(58): 36670-36683.
- [27] DA SILVA R M, JR., DA SILVA NETO J R, SANTOS C S, et al. Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the detection of fungi directly from blood cultures and cerebrospinal fluid from patients with suspected invasive mycoses[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2015, 14(21): 675-688.
- [28] PROCOP G W. Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens[J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 45 Suppl 2(5): S99-S111.
- [29] MEDYANTSEVA E P, KHALDEEVA E V, GLUSHKO N I, et al. Amperometric enzyme immunosensor for the determination of the antigen of the pathogenic fungi *Trichophyton rubrum*[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 411(1/2): 13-18.
- [30] ZHANG Y, LAI B S, JUHAS M. Recent advances in aptamer discovery and applications[J]. *Molecules*, 2019, 24(5): 112-121.
- [31] ZHU Z, SONG Y, LI C, et al. Monoclonal surface display SELEX for simple, rapid, efficient, and cost-effective aptamer enrichment and identification[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(12): 5881-5888.
- [32] KABA H E, PÖLDERL A, BILITEWSKI U. Short peptides allowing preferential detection of *Candida albicans* hyphae[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(17): 8629-8633.
- [33] GRANGER J H, SCHLOTTER N E, CRAWFORD A C, et al. Prospects for point-of-care pathogen diagnostics using surface-enhanced Raman scattering (SERS) [J]. *Chem Soc Rev*, 2016, 45(14): 3865-3882.
- [34] GUO J, ZHONG Z, LI Y. “Three-in-one” sers adhesive tape for rapid sampling, release, and detection of wound infectious pathogens[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(6): 198-214.
- [35] MABBOTT S, THOMPSON D, SIRIMUTHU N, et al. From synthetic DNA to PCR product: detection of fungal infections using SERS[J]. *Faraday Discuss*, 2016, 187(32): 461-472.
- [36] MOHAMMED Y F, SALEM E Z, SHAHIN I M, et al. Applicability of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in rapid identification of some *Candida* and dermatophyte species infections in humans[J]. *Inter J Dermatol*, 2016, 55(10): 1164-1171.
- [37] RESLOVA N, MICHNA V, KASNY M, et al. xMAP technology: applications in detection of pathogens[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8(3): 55-69.
- [38] FAROOQI J, JABEEN K, SAEED N, et al. Species identification of invasive yeasts including *Candida* in Pakistan: limitations of phenotypic methods[J]. *J Pak Med Assoc*, 2012, 62(10): 995-998.
- [39] HO C S, JEAN N, HOGAN C A, et al. Rapid identification of pathogenic bacteria using Raman spectroscopy and deep learning[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4927.
- [40] LIU L, YUAN Y, ZHANG J, et al. Automatic identification of fungi under complex microscopic fecal images[J]. *J Biomed Opt*, 2015, 20(7): 76004.
- [41] CUNHA C R A, ANDRADE C G, PEREIRA M I A, et al. Quantum dot-Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2018, 178(6): 85-91.