

度指数是反映其严重程度客观评价指标。目前BASDAI是最常用于评价AS患者疾病活动度的指标。杜旭娜等^[9]研究发现,即使在评价无外周关节受累的AS病情活动度时BASDAI仍是最有效的评价工具。本研究中的AS患者大多处于疾病活动期,大多数AS患者病情比较严重。AS患者HLA-B27基因表达量与AS疾病活动有关,据此可以推断HLA-B27基因表达量可作为AS病情活动度评估的实验室指标,客观地反映AS患者病情严重程度。

HLA-B27基因具有多态性,而且不同的基因亚型在不同条件下与AS遗传易感性不尽一致。本研究发现,AS患者与HLA-B27:04关联性最强,其次为HLA-B27:05,与相关文献研究相似^[8,10]。我们对检测到的HLA-B27阳性AS患者中HLA-B27:04和HLA-B27:05两种亚型临床表现等方面进行比较,发现差异均无统计学意义。推测HLA-B27不同亚型在AS患者中的作用可能与亚型之间的共有序列有着密切的关系,而HLA-B27基因因碱基突变等导致的各个亚型与AS的临床特征或许没有直接的关系。实验中我们还检测到2例HLA-B27阴性的AS患者,提示其他易感基因或者致病因素在AS发病中起着一定的作用。

综上所述,HLA-B27基因表达量与AS疾病活动指数存在相关性,联合HLA-B27基因表达水量及其亚型检测可能会为及早筛选、诊断AS并判断疾病活动情况提供依据。

参考文献:

[1] Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, et al. Global prevalence of ankylosing spondylitis[J]. Rheumatology, 2014, 53(4): 650-657.

[2] Robinson PC, Brown MA. The genetics of ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2012, 38(3): 539-553.

[3] Jiang Y, Yang M, Wu H, et al. The relationship between disease activity measured by the BASDAI and psychological status, stressful life events, and sleep

quality in ankylosing spondylitis[J]. Clinical Rheumatology, 2015, 34(3): 503-510.

[4] Zambrano-Zaragoza JF, Agraz-Cibrian JM, González-Reyes C, et al. Ankylosing spondylitis: from cells to genes[J]. International Journal of Inflammation, 2013(50): 1653.

[5] Raychaudhuri SP, Deodhar A. The classification and diagnostic criteria of ankylosing spondylitis[J]. J Autoimmun, 2014(48/49): 128-133.

[6] Johnsen SS, Bakland G, Nossent JC. The distribution of HLA-B27 subtype in patients with ankylosing spondylitis in Northern Norway [J]. Scandinavian Journal of Rheumatology, 2014, 43(4): 296-300.

[7] Ng EK, Chong WW, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening[J]. Gut, 2009, 58(10): 1375-1381.

[8] 张志坚, 奚永志, 孙玉英. 全基因组单核苷酸多态性与强直性脊柱炎遗传易感性的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(18): 1289-1291.

Zhang ZJ, Xi YZ, Sun YY. Progress of genetic susceptibility of the whole genome single nucleotide polymorphism and ankylosing spondylitis[J]. Natl Med J China, 2011, 91(18): 1289-1291.

[9] 杜旭娜, 李 晏, 张胜利, 等. 比较BASDAI和mini-BASDAI对强直性脊柱炎病情的判断价值[J]. 军医进修学院学报, 2012, 33(6): 556-558.

Du XN, Li Y, Zhang SL, et al. Value of bath ankylosing spondylitis disease activity index and mini-bath ankylosing spondylitis disease activity index for diagnosis of ankylosing spondylitis[J]. Journal of Chinese PLA Postgraduate Medical School, 2012, 33(6): 556-558.

[10] 孙灵迪, 梅传忠, 鹿 永, 等. PCR-SBT与IMS-ELISA法在强直性脊柱炎患者HLA-B27检测中的比较[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(2): 16-18.

Sun LD, Mei CZ, Lu Y, et al. Comparison analysis of HLA-B27 detection by PCR-SBT and IMS-ELISA in AS patients[J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(2): 16-18.

收稿日期: 2015-07-18 修回日期: 2015-08-24

念珠菌耐药机制研究进展*

侯 欣^a, 张 丽^a, 徐英春^a, 赵玉沛^b

(中国医学科学院北京协和医院 a. 检验科; b. 基本外科, 北京 100730)

摘要: 近年来念珠菌感染的流行病学发生改变, 尽管白念珠菌仍是大多数医院引起侵袭性念珠菌病的主要病原体, 但是

* 基金项目: 卫生公益性行业科研专项(项目编号: 201402001)。

作者简介: 侯 欣(1990—), 女, 博士研究生, 主要从事微生物鉴定及耐药机制研究。

通讯作者: 徐英春, 研究员, E-mail: xycpumch@139.com

非白念珠菌的感染比例有所增加。不同种念珠菌对不同药物的敏感性不同,耐药现象成为念珠菌感染治疗的主要问题,抗菌药物常导致临床念珠菌感染治疗失败。了解念珠菌耐药机制对提高患者预后和加强感染控制十分重要。该文对念珠菌的耐药机制做一综述。

关键词:念珠菌;抗真菌药物耐药;药敏试验;耐药基因

中图分类号:R379.4;R446 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2016)01-060-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.017

Research Review on Antifungal Drug Resistance Mechanisms in *Candida Spp*

HOU Xin^a,ZHANG Li^a,XU Ying-chun^a,ZHAO Yu-peib^b

(a. Department of Clinical Laboratory ;b. Department of General Surgery ,Peking Union Medical College Hospital Chinese Academy of Medical Sciences ,Beijing 100730,China)

Abstract:In recent years,the epidemiology of *Candida* infection has changed. Although *Candida albicans* is still the main pathogens causing invasive candidiasis,non-albicans *Candida species* are increasingly encountered. Different *Candida* species show distinct sensitivity of different drugs. The emergence of drug resistance has become the main problem of *Candida* infection treatment. Antifungal resistance of clinical *Candida* infections often lead to treatment failure. The review of resistance mechanisms and the effect on clinical treatment is very significant to improve the prognosis of patients and strengthen the control of infection. This text reviews the present state of the detection of mechanisms of resistance in *Candida spp*.

Keywords:*Candida spp*; antifungal drug resistance; antimicrobial susceptibility test; resistance gene

随着肿瘤、器官移植后接受免疫抑制剂治疗、HIV 感染患者等高危人群的增加,近年来念珠菌感染率不断提高。在美国,念珠菌是引起医院获得性血流感染第四位常见病原菌^[1],在欧洲,念珠菌在院内血流感染分离菌中居前十位^[2]。侵袭性念珠菌病(invasive candidiasis,IC)严重威胁着医院和社区患者的生命健康,并且死亡率较高。白念珠菌是引起 IC 的主要病原体,但近几年非白念珠菌感染比例有所增加,而且非白念珠菌对抗真菌药物常表现为耐药或不敏感。流行病学改变的原因之一是唑类药物的广泛使用筛选出较不敏感的念珠菌。另外,中央静脉导管的使用、胃肠道手术、糖皮质激素的使用、高龄等也是非白念珠菌感染增加的原因。近期一篇综述系统分析了全世界念珠菌菌种在血流感染中的分布,结果发现美国、欧洲北部和中部以白念珠菌为主,亚洲、欧洲南部和北美洲以非白念珠菌为主^[3]。此外,除地理位置外,念珠菌分布也会受医疗条件、抗生素使用等因素的影响。为了更好地了解念珠菌的耐药机制以便提高患者预后和加强感染控制,我们回顾文献,对念珠菌耐药机制研究进展综述如下。

1 微生物学耐药和临床耐药 微生物学耐药与临床耐药既有联系又有区别。微生物学耐药是指通过体外试验发现病原体对某种药物不敏感,与同种其它菌株比较区分是天然耐药或获得性耐药;临床耐药是指在临床治疗过程中给予足够剂量药物,然而真菌感染依旧持续。虽然微生物学耐药能够引起临床耐药,但还受其他因素的影响,如免疫功能受损、基础疾病、药物生物利用度降低、药物代谢增加等。体外敏感的菌株也可能导致临床抗真菌治疗失败,可能是药物在感染部位浓度不足,患者免疫力低下无法根除致病菌^[4]。

同样,体外药敏试验耐药也可能对临床治疗有效,可能是患者自身免疫力能够清除致病菌,或者抗菌药物在感染

部位浓度较高,药物在感染部位协同作用等。念珠菌交叉耐药也值得引起关注,唑类药物交叉耐药在白念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、热带念珠菌中均有报道^[5]。棘白菌素类药物交叉耐药可见于白念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌等^[6]。尽管唑类和棘白菌素类药物交叉耐药现象少见,但已有光滑念珠菌交叉耐药的出現^[5]。真菌体外药敏试验需要规范化,抗生素在人体内作用复杂,微生物耐药性判断具有主观性,应用于临床时需要衡量和判断。抗真菌药物长期、低剂量的预防和治疗是真菌产生耐药性的重要原因。

2 抗真菌药物耐药检测方法 随着侵袭性真菌感染和抗真菌药物的增多,准确、快速、重复性好的真菌药敏试验对指导临床医生用药十分重要。与细菌类似,真菌耐药性也是通过抑制真菌生长进行检测。常用的检测方法有纸片扩散法、微量肉汤稀释法、Etest 等。

2.1 酵母菌的纸片扩散法药敏试验只适用于念珠菌属所检测的药物也仅限于氟康唑、伏立康唑、卡泊芬净三种,只能判断敏感、中介和耐药,不能定量。

2.2 微量肉汤稀释法 该法应用最广,包括实验室标准方法和商品化方法,可获得最低抑菌浓度(MIC)。然而,MIC 值受到待测菌浓度、培养温度和时间、培养液 pH、结果判读等因素的影响。因此药敏试验标准化显得尤为重要,需要大量连续重复试验制定 MIC 折点。临床和实验室标准协会(CLSI)和欧洲委员会的药敏试验(EUCAST)是目前国际上应用最广的操作标准参考,均有良好的重现性并提供质控方法。另外,EUCAST 和 CLSI 均提出临床药敏折点(CBP)和流行病学阈值(ECVs)的概念,折点解释需要分析 MIC 的分布以及 MIC 和临床效力的关系,ECVs 有助于检测分子水平定义的敏感性降低的非野生株。在结果的判定方面,除敏感、中介、耐药界值外,还有剂量依赖性敏感

(susceptible-dose dependent, S-DD), 它表示给予高于一般给药剂量, 且达到最大血药浓度时, 临床有效; S-DD 界值的定义反映出抗真菌药物剂量和生物利用度的最大化对治疗成功至关重要。CLSI 和 EUCAST 中的敏感、中介、剂量依赖性敏感、耐药具有种特异性, 依据 MIC 分布、药代动力学、药效动力学、耐药机制、野生型和非野生型的区别和治疗结局等进行判断。

目前也出现商业化肉汤稀释改良的方法, 如 ATB FUNGUS, Sensititre YeastOne 检测念珠菌药物敏感性, 与参考方法具有较高相关性。

2.3 Etest 法 该法结合了纸片扩散法及微量肉汤稀释法的优点, 操作简便。念珠菌 E-test 药敏检测原理与细菌类似。根据不同种药物的杀菌机制不同, 其判读方法也不相同。两性霉素 B 的判读终点在生长被完全抑制处; 氟胞嘧啶的判读终点在 95% 菌被抑制处; 唑类药敏 MIC 值判读在 80% 菌被抑制处。因此, E-test 药敏结果的正确读取是 MIC 准确报告的前提。

2.4 新的检测技术 如 MALDI-TOF MS, 流式细胞, X-碟, 氧化铝多孔培养也应用到真菌耐药性检测中^[7]。de Carolis 等^[8,9]研究者利用 MALDI-TOF MS 仅需 15h 便可检测真菌对棘白菌素的敏感性, 仅需 3 h 就能区分卡泊芬净耐药和敏感的白念珠菌, 与传统方法相比更加快速、有效; 流式细胞技术是通过检测细胞荧光观察药物对真菌细胞的活性影响来判断药物敏感性; X-碟技术是快速、划算的显色琼脂稀释法, 可同时进行念珠菌的鉴定和氟康唑药敏试验; 多孔氧化铝培养法与显微镜相互结合可检测两性霉素 B、阿尼芬净、卡泊芬净、伊曲康唑和伏立康唑的敏感性。此外分子生物学相关方法, 如检测耐药基因判断念珠菌的敏感性也引起广泛关注^[10]。有文献报道, 二代测序技术能够全面广泛地深度分析念珠菌基因组, 检测与耐药相关的基因突变, 为检测念珠菌对棘白菌素和唑类药物耐药提供了新的视角, 将会成为探讨临床多重耐药菌株耐药机制的新平台^[11]。

3 唑类药物的耐药性 唑类抗真菌药物是麦角固醇生物合成的抑制剂, 主要针对麦角固醇合成通路上的 14- α 羊毛甾醇去甲基化酶, 该酶将羊毛甾醇催化为麦角固醇, 后者是真菌细胞膜的重要组成部分。14- α 羊毛甾醇去甲基化酶的活性部位有一个血色素成分, 唑类抗真菌药物通过游离氮原子和血色素的铁原子结合, 抑制 14- α 羊毛甾醇去甲基化酶的催化活性, 从而影响麦角固醇生成, 破坏真菌细胞膜的完整性, 发挥抑制真菌生长繁殖的作用。唑类抗真菌药物具有良好的生物利用度和可靠的安全性, 是临床使用最多的治疗念珠菌感染的药物, 但由于其对念珠菌主要起抑菌作用, 因此在长期治疗和反复给药过程中易引起真菌耐药性的产生。

CLSI 和 EUCAST 都有种特异性唑类药物的折点并且定期进行更新。念珠菌中唑类药物耐药较常见。中国侵袭性真菌监测网(CHIF-NET)连续三年对四种, 共 1 072 株非白念珠菌药物敏感性的研究表明近平滑念珠菌复合体中对唑类药物的敏感率 $\geq 97.5\%$ 。但是, 在热带念珠菌株中, 11.6% 对氟康唑耐药, 9.5% 对伏立康唑耐药, 7.1% 对这两种药物均耐药。光滑念珠菌中, 14.3% 对氟康唑耐药,

11.6% 对氟康唑和伏立康唑交叉耐药。所有的克柔念珠菌株对伏立康唑、泊沙康唑和伊曲康唑均敏感^[12]。其耐药机制为:

3.1 外排泵基因过表达引起, 导致 14- α 羊毛甾醇去甲基化酶作用位点处药物浓度降低。外排泵由 ATP 结合盒(ABC)的 CDR 基因和协助转运蛋白超家族(MFS)泵的 MDR 基因编码, CDR 编码外排泵的菌株对大多数唑类药物耐药, 而 MDR 编码的菌株选择性的对氟康唑耐药^[13]。

3.2 14- α 羊毛甾醇去甲基化酶作用位点改变或上调, 由基因 ERG11 编码。克柔念珠菌对氟康唑天然耐药是由于氟康唑对 ERG11p 的亲和力降低。从患者体内分离出的耐药念珠菌的胞内 ERG11p 浓度较敏感菌株高, 使得正常治疗浓度无法抑制麦角固醇的合成。麦角固醇减少导致细胞膜结构和功能改变从而抑制菌株生长。一些基因干扰与唑类药物耐药有关。此外, ERG11 突变与蛋白质三维结构改变有关, 引起去甲基酶和抗生素相互作用位点改变。其他基因改变包括染色体复制、基因转换、有丝分裂重组等均与念珠菌唑类药物耐药有关。

3.3 旁路效应。真菌暴露于唑类药物导致细胞膜麦角固醇合成减少而其他有毒甾醇累积, 影响细胞膜功能。一个真菌细胞可有多重耐药机制共同存在, 长期抗真菌治疗可诱导耐药^[14]。

4 棘白菌素类的耐药性 美国感染病学会(IDSA)指南指出棘白菌素类药物作为治疗中重度系统性念珠菌病的一线药物。棘白菌素类药物属脂肽分子, 能够非竞争性地抑制 β -1,3-D-葡聚糖合成酶, 后者是葡聚糖合成的必需酶, 葡聚糖是真菌细胞壁的基本结构。体外大多数念珠菌对棘白菌素敏感, 是临床治疗念珠菌血症的一线药物。近平滑念珠菌的 MIC 值较其他念珠菌高, 原因是 FKS1 上的氨基酸天然改变, FKS1 是一种葡聚糖合成酶, 为棘白菌素类药物作用的靶点。但是, 此现象与临床的相关性不大^[15]。药敏试验体外检测的 MIC 值较高, 可导致临床侵袭性真菌病患者治疗失败^[16]。目前 CLSI 包括三种棘白菌素类药物(卡泊芬净、米卡芬净、阿尼芬净), EUCAST 仅包括后两种。大多数念珠菌对棘白菌素敏感, 但已有临床耐药菌株的报道^[17,18]。其耐药机制为:

4.1 适应性应激反应 真菌细胞壁在真菌的生长和发展中是一个动态变化的结构, 对真菌的生存十分重要。棘白菌素类药物能够改变细胞壁的完整性使胞内压力增加, 真菌对环境压力也有一定的适应性应激反应, 可诱导细胞壁几丁质增多, 取代 β -1,3-D-葡聚糖, 使 MIC 增高^[19]。

4.2 获得性 fks 基因突变 fks 基因编码葡聚糖合成催化亚基, fks1 和 fks2 位于高度保守区, 突变常发生于这两个基因的热点(hot spots, HSs)上, 引起蛋白质氨基酸替换, 导致葡聚糖合成敏感性降低, MIC 升高。fks 突变是棘白菌素治疗失败的独立因素, 在临床治疗效果预测中检测 fks 基因突变优于 MIC^[20]。

4.3 固有 fks 突变 主要见于近平滑念珠菌和季也蒙念珠菌, 葡聚糖合成下降较获得性耐药菌株幅度小^[21]。

5 氟胞嘧啶的耐药性 氟胞嘧啶主要与其他抗真菌药物联合使用治疗隐球菌病和某些念珠菌病, 通过嘌呤-嘧啶通透酶进入细胞, 该酶主要由 FCY2 基因编码。进入细胞后

在 FCY1 基因编码的胞嘧啶脱氨酶和 FUR1 基因编码的转磷酸核糖基酶的作用下转化为氟二氧嘧啶(FU)和氟脲糖苷磷酸盐(FUMP)。FUMP 进一步转化为氟尿苷三磷酸,后者可代替尿苷酸参与真菌 RNA 的合成,进而干扰蛋白质的合成。氟胞嘧啶的耐药机制主要由 FCY2、FCY1 和 FUR1 基因突变导致药物摄入受阻,难以在胞内转化发挥作用。这些基因突变在白念珠菌和葡萄牙念珠菌均有发现^[22]。

6 两性霉素 B 的耐药性 已有研究发现,两性霉素 B 药敏试验参考方法存在纰漏,有一定的局限性,RPMI 培养液只有 3 个或 4 个药物倍比稀释浓度,较窄区间难以判断敏感或耐药菌株^[23]。目前应用广泛的是流行病学阈值(ECVs)判断野生型或非野生型^[24]。念珠菌对两性霉素 B 的敏感性较高,CHIF-NET 连续三年对四种,共 1 072 株非白念珠菌药物敏感性的研究表明念珠菌属对两性霉素 B 的敏感性>99.3%^[12]。

由于耐药菌株很少,相关耐药机制研究也较少。有研究发现其耐药性与突变导致细胞膜麦角固醇合成减少和磷脂水平组成紊乱有关,突变基因包括 ERG2、ERG3、ERG5、ERG6 和 ERG11。此外,多烯诱导真菌细胞产生氧化压力使耐药菌株抗氧化酶活性增高,自由基生成量改变^[25]。目前还没有可靠的分子生物学方法检测两性霉素 B 的耐药性。有麦角固醇定量检测或测定自由基的含量及催化活性的相关报道,但这些方法目前均未标准化。因此,分子检测不是预防和控制两性霉素 B 耐药的最好选择,MIC 法较分子方法检测两性霉素 B 耐药性更加实用。

7 生物膜 研究表明,念珠菌可以在体内植入的人工器官或导管等惰性物质或其它生物表面形成黏滑的膜,它是一种由基底芽生孢子层、菌丝成分和细胞外多聚基质三部分组成的结构群体,称为生物膜(biofilm)。生物被膜可在惰性物质表面形成,故经常污染医学设备,引起慢性阴道感染以及在免疫功能低下的人群中导致系统性感染。白念珠菌生物膜形成生长的一个较严重后果是对临床一些常用抗真菌感染药物产生高度耐药性。有研究报道,白念珠菌形成生物被膜后对氟康唑的敏感性下降几百倍,对两性霉素 B 的敏感性下降几十倍。生物膜耐药是导致临床上许多系统性、反复性感染的重要原因^[26]。

8 临床对抗真菌药物耐药性的影响 抗真菌药物耐药性与 MIC 增高有关,后者与临床感染治疗失败、费用昂贵等有关。Pfaller 等^[27]研究者曾报道用氟康唑、伏立康唑治疗感染敏感菌株患者的临床结局远远优于耐药菌株感染患者,棘白菌素类药物治疗感染时也有此现象。真菌耐药性导致高危患者预防性使用抗真菌药物。除了高致病率和致死率外,侵袭性念珠菌感染与高昂的医疗费用和住院时间延长有关,同时关系到相关医疗策略,如个体化治疗,结合患者的实际情况选择合适的药物;系统性的策略如预防用药、耐药监测都可引起真菌药敏试验模式的改变和抗真菌药物指南的制定。

9 念珠菌耐药的流行病学 全球性大型监测项目提供了大量医院和实验室重要的耐药现状相关数据。ARTEMIS DISK 全球抗真菌检测研究是其中最大、最早的监测项目之一,采用 CLSI 纸片扩散法分析不同念珠菌对氟康唑和

伏立康唑的敏感性。在 Pfaller 等^[28]研究者最近的一篇文章中显示 90.2% 的念珠菌对氟康唑敏感,13/31 种念珠菌敏感性降低,伏立康唑耐药率<5%,1/3 对氟康唑耐药的菌株对伏立康唑敏感。SENTRY 抗菌监测项目近期报道中,光滑念珠菌对氟康唑的耐药率达到 8.8%,对棘白菌素的敏感性降低,而且出现交叉耐药^[27],值得引起关注。

10 结论 表型检测念珠菌耐药性是一种可靠的方法,按照参考方法测定 MIC 是检测临床菌株耐药性的金标准。分子水平耐药性研究也广受关注,其对临床实验室有一定的意义,但缺乏标准化,有必要进行包括第三方确认和重复性评估的多中心研究。念珠菌耐药性研究有助于指导临床用药,有效控制感染。在不久的将来,新的自动化和大规模测序技术可能会改变抗生素敏感性检测流程,为念珠菌耐药机制研究提供新的思路。

参考文献:

- [1] Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent S M, et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals; analysis of 24 179 cases from a prospective nationwide surveillance study[J]. Clin Infect Dis, 2004, 39(3): 309-317.
- [2] Bouza E, Munoz P. Epidemiology of candidemia in intensive care units[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(Suppl 2): S87-S91.
- [3] Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida spp* among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world; a systematic review[J]. Int J Infect Dis, 2010, 14(11): e954-e966.
- [4] Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and candida infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards[J]. Clin Infect Dis, 1997, 24(2): 235-247.
- [5] Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, et al. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(4): 1199-1203.
- [6] Pfaller M, Boyken L, Hollis R, et al. Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Candida* species to anidulafungin, caspofungin, and micafungin[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(2): 624-629.
- [7] Posteraro B, Sanguinetti M. The future of fungal susceptibility testing[J]. Future Microbiol, 2014, 9(8): 947-967.
- [8] de Carolis E, Vella A, Florio AR, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of

- Candida* and *Aspergillus* species[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(7): 2479-2483.
- [9] Vella A, De Carolis E, Vaccaro L, et al. Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(9): 2964-2969.
- [10] Perlin DS. Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? [J]. Curr Opin Infect Dis, 2009, 22(6): 568-573.
- [11] Garnaud C, Botterel F, Sertour N, et al. Next-generation sequencing offers new insights into the resistance of *Candida spp.* To echinocandins and azoles [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2015, 70(9): 2556-2565.
- [12] Xiao M, Fan X, Chen SC, et al. Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance[J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(3): 802-810.
- [13] Kanafani ZA, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(1): 120-128.
- [14] Vale-Silva L, Ischer F, Leibundgut-Landmann S, et al. Gain-of-function mutations in PDR1, a regulator of antifungal drug resistance in *Candida glabrata*, control adherence to host cells[J]. Infect Immun, 2013, 81(5): 1709-1720.
- [15] Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S, et al. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(7): 2305-2312.
- [16] Sun HY, Singh N. Characterisation of breakthrough invasive mycoses in echinocandin recipients: an evidence-based review[J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 35(3): 211-218.
- [17] Jensen RH, Johansen HK, Arendrup MC. Stepwise development of a homozygous S80P substitution in Fks1p, conferring echinocandin resistance in *Candida tropicalis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(1): 614-617.
- [18] Duran-Valle MT, Gago S, Gomez-Lopez A, et al. Recurrent episodes of candidemia due to *Candida glabrata* with a mutation in hot spot 1 of the FKS2 gene developed after prolonged therapy with caspofungin [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(6): 3417-3419.
- [19] Lee KK, MacCallum DM, Jacobsen MD, et al. Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance in vivo[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(1): 208-217.
- [20] Shields RK, Nguyen MH, Press EG, et al. The presence of an FKS mutation rather than MIC is an independent risk factor for failure of echinocandin therapy among patients with invasive candidiasis due to *Candida glabrata*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(9): 4862-4869.
- [21] Beyda ND, Lewis RE, Garey KW. Echinocandin resistance in *Candida species*: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches [J]. Ann Pharmacother, 2012, 46(7/8): 1086-1096.
- [22] Florent M, Noel T, Ruprich-Robert G, et al. Non-sense and missense mutations in FCY2 and FCY1 genes are responsible for flucytosine resistance and flucytosine-fluconazole cross-resistance in clinical isolates of *Candida lusitanae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(7): 2982-2990.
- [23] Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, et al. Detection of resistance to amphotericin B in *Candida* isolates by using Iso-Sensitest broth[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(7): 2070-2074.
- [24] Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Canton E, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida spp.* as determined by CLSI broth microdilution[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(6): 2040-2046.
- [25] Vincent BM, Lancaster AK, Scherz-Shouval R, et al. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B[J]. PLoS Biol, 2013, 11(10): e1001692.
- [26] Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, et al. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance[J]. Future Microbiol, 2013, 8(10): 1325-1337.
- [27] Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, et al. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(8): 2571-2581.
- [28] Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Results from the artemis DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10. 5-year analysis of susceptibilities of *Candida Species* to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1366-1377.