

烟曲霉对唑类药物耐药研究的最新进展

陈勇 卢中一 靳远 韩黎 黄留玉

100071 北京,军事医学科学院疾病预防控制中心医院感染监控中心(陈勇、卢中一、韩黎),传染病控制中心(黄留玉);100071 北京,军事医学科学院生物工程研究所生物信息室(靳远)

通信作者:韩黎, Email:hanlicdc@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.12.025

【摘要】 烟曲霉是一种重要的临床致病真菌,可引发致死性霉菌感染。唑类药物是治疗各类曲霉病的临床一线药物。近年来,全世界范围内烟曲霉对唑类药物耐药的报道不断增加,严重影响临床和农药唑类药物使用的有效性,已成为一个重要公共卫生问题。本文主要对烟曲霉唑类药物耐药的流行现状、耐药分子机制、耐药产生的原因、耐药株的进化规律以及防控措施等分别进行介绍。

【关键词】 烟曲霉;唑类药物;耐药;流行病学;进化

基金项目:生物安全关键技术研发重点专项(2016YFC1200100)

Progress of research on azole resistance in *Aspergillus fumigatus* Chen Yong, Lu Zhongyi, Jin Yuan, Han Li, Huang Liuyu

Department of Hospital Infection Control, Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China (Chen Y, Lu ZY, Han L); Department of Infectious Disease, Institute of Disease Prevention and Control, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China (Huang LY); Department of Bioinformatics, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China (Jin Y)

Corresponding author: Han Li, Email: hanlicdc@163.com

【Abstract】 Being an important clinical fungal pathogen, *Aspergillus (A.) fumigatus* can cause fatal invasive fungal infections. Azoles are the first line drugs in treating various *Aspergillus*-caused diseases. Worldwidely, reports related to azole resistance in *A. fumigatus* have been increasing which posing a threat on the effectiveness of clinically used azole and agricultural fungicides. Currently, it has become an important public health issue. In this review, we summarize findings from literature regarding the following areas: the occurrence of azole resistance in *A. fumigatus*, the molecular mechanisms of resistance, contributing factors for the emergence of azole resistance, evolution of resistant strains and related control and prevention measures.

【Key words】 *Aspergillus fumigatus*; Azole drugs; Drug resistance; Epidemiology; Evolution

Fund program: The National Special Project on Research and Development of Key Biosafety Technologies (2016YFC1200100)

曲霉菌[*Aspergillus (A.) spp.*]是一类在自然环境中(如空气、土壤和腐烂有机物等)广泛存在的机会致病真菌,常以无性产孢形式快速繁殖和播散,可导致人和动物出现过敏性、慢性和急性曲霉病,其中侵袭性曲霉病(invasive aspergillosis, IA)是一种严重的致死性霉菌感染,采取治疗措施后其病死率仍达30%以上^[1-2]。患者可因吸入空气中的孢子而发生多种曲霉病,其中以IA最为严重,尽管医院采取了许多措施降低空气中曲霉孢子浓度,但血液移植、慢性阻塞性肺疾病、接受实体器官移植等高危人群发生IA的风险仍然非常高。据保守估计,欧洲每年约有6万例IA患者^[3],而中国每年IA患者至少有16万例,造成了沉重的疾病负担^[4]。

烟曲霉(*A. fumigatus*)是导致IA的最常见病原体,已成为导致住院患者死亡的一类主要感染性病原体^[5]。唑类药物是曲霉病治疗最主要的一线药物,其他抗真菌药物如两性霉素B和卡泊芬净等只作为后备药物使用^[6]。在出现唑类药物之前,IA患者的出院死亡率超过了70%,使用唑类药物可使IA患者出院死亡率降至30%左右^[2]。近年来,许多国家分离的烟曲霉开始出现对唑类药物的多重耐药和泛耐药^[7],部分医疗机构唑类耐药烟曲霉的检出率高达10%^[8],给临床治疗带来很大困难,由耐药菌株导致的IA患者死亡率可达88%~100%^[3],对患者生命构成重大威胁。

一、烟曲霉对唑类药物耐药的流行现状

目前临床使用的治疗曲霉病的唑类药物主要有4种,包

括伊曲康唑(1997年开始在临床使用)、伏立康唑(2002年)、泊沙康唑(2006年)和艾沙康唑(2015年)。常用于治疗念珠菌病的氟康唑由于对烟曲霉呈现天然耐药而不能用于治疗曲霉病。烟曲霉对唑类耐药的判定主要依据美国临床和实验室标准研究所(CLSI)或欧洲抗生素敏感性检测委员会(EUCAST)制定的针对丝状真菌的药敏实验方法测定的最低抑菌浓度(MICs),其中CLSI没有规定耐药的判定范围,通常根据流行病学截断值(epidemiologic cutoff values, ECVs)来确定是否为非野生型菌株(伊曲康唑MIC>2 mg/L,伏立康唑MIC>1 mg/L或泊沙康唑MIC>0.5 mg/L)^[9],而EUCAST则制定了耐药判定范围(伊曲康唑MIC>2 mg/L,伏立康唑MIC>2 mg/L或泊沙康唑MIC>0.25 mg/L)^[10]。

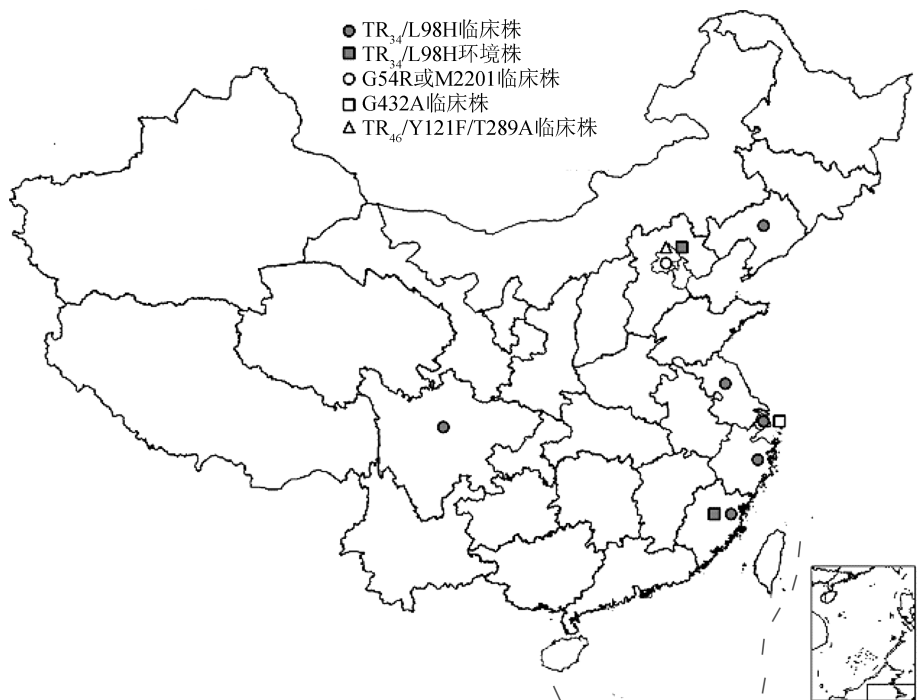
自1997年美国首次报道出现伊曲康唑耐药的烟曲霉以来,全世界范围对三唑类耐药烟曲霉检出报道不断增加,已成为一个重要公共卫生问题^[7,11]。目前至少有18个国家报道在临床和/或环境分离的烟曲霉中检出唑类药物耐药菌株,这些国家来自欧洲、亚洲、美洲、非洲、大洋洲地区^[12],其中以荷兰、英国、印度等国家耐药形势最为严峻。1994—1999年荷兰分离烟曲霉伊曲康唑耐药率仅为1.8%,2009—2011年已达到6.8%^[13],2015年不同医院烟曲霉对唑类药物耐药率为5%~10%,其中高危患者分离菌株耐药率达30%^[8,14]。英国1997—1998年尚无耐药烟曲霉报道,2009年唑类药物耐药率已达20%^[15]。2012年印度从农业和临床环境分离的630株烟曲霉中,44株对伊曲康唑耐药,耐药率高达7%^[16]。2005年中国北京大学课题组首次从1例肺病患者中检出4株烟曲霉对伊曲康唑耐药^[17]。2015年中国医学科学院Liu等^[18]从72株临床烟曲霉中检出4株唑类耐药株(5.6%)。最近,中国军事医学科学院疾病预防控制中心Chen等^[19]从多地区收集的317株临床烟曲霉和144株环境烟曲霉中分别检出8株(2.5%)和2株(1.4%)唑类耐药株。提示我国烟曲霉耐药形势值得高度关注。

二、唑类药物耐药的分子机制

唑类药物对烟曲霉的作用靶点是细胞膜成分麦角固醇生物合成的羊毛甾醇14- α -去甲基化酶(Cyp51),唑类药物通过与该酶结合影响麦角固醇生物合成通路,造成毒性醇类物质堆积,从而发挥杀菌作用。目前已知的烟曲霉主要耐药机制有靶蛋白点突变或过度表达、外排泵表达升高和应激适应介导耐药3种^[14],其中Cyp51A基因是唑类耐药的一个热点,过

去的19年已经发现了至少15个耐药相关的突变位点,如G54、L98、M220、Y121等,其中可能还包括在Cyp51A基因启动子区域出现不同长度的串联重复序列(tandem repeat, TR)^[20]。TR₃₄/L98H和TR₄₆/Y121F/T289A是两种最常见的耐药突变基因型,前者主要与伊曲康唑高度耐药有关,耐药株常对多种唑类药物耐药,后者主要与伏立康唑高度耐药有关^[12]。TR₃₄/L98H突变型烟曲霉于1998年首次在荷兰患者分离的菌株中被发现^[21-22],随后在欧洲、亚洲、非洲和美洲地区的多个国家检出,目前已发展为许多国家临床和环境烟曲霉的主要耐药机制。出现TR₃₄/L98H突变(或同时携带S297T/F495I突变)也是我国烟曲霉耐药的主要分子机制^[19]。TR₄₆/Y121F/T289A突变型烟曲霉于2011年首次在荷兰的侵袭性曲霉病患者中分离^[23],随后研究人员从2009—2011年收集的1315株烟曲霉中发现21株TR₄₆/Y121F/T289A突变株,并从6个不同的环境采样点分离出该突变株^[13]。2015年,我国首次在北京某医院患者分离的烟曲霉中报道检出TR₄₆/Y121F/T289A突变基因型^[24]。结合相关报道,我国不同耐药分子机制烟曲霉检出情况及其地理分布如图1所示,目前唑类耐药烟曲霉主要分布于我国东南地区和华北地区,TR₃₄/L98H是播散范围最广的一种耐药机制。

外排泵和TAC1、MRR1和UPC2等转录因子在念珠菌对唑类药物耐药过程中发挥了重要作用^[25],而针对非CYP51A突变介导的烟曲霉唑类耐药机制相关研究较少,导致主要协同转运蛋白超家族(MFS)外排泵、三磷酸腺苷结合盒蛋白超家族(ABC)转运子以及多种转录调控因子对烟曲霉耐唑类药物产生的作用尚不明确。基于基因组数据的分析显示,烟曲霉中至少有50个编码ABC转运子和300个编码MFS转运



注:其中TR₃₄/L98H突变株包含同时携带S297T/F495I突变的菌株

图1 Cyp51A不同突变类型唑类药物耐药烟曲霉在我国的检出情况

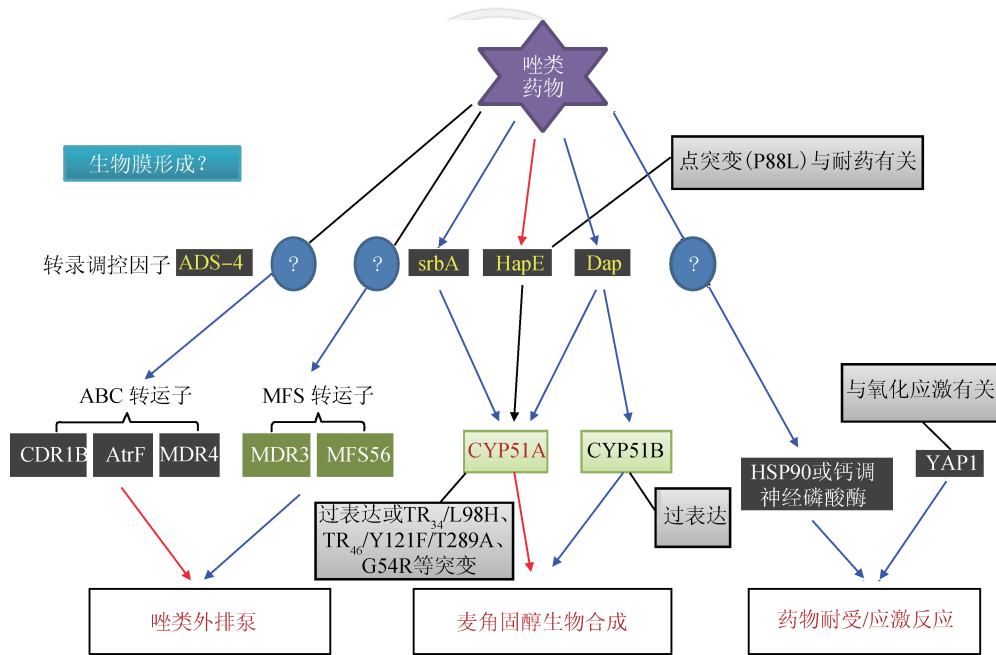
子的基因^[26],但其中只有少部分可能与唑类耐药相关,如 ABC 转运子基因 *AfuMDR4*, *AtrF* 和 *cdr1B* 等^[26-27]及 MFS 类转运子 *MFS56* 等^[28-29]。还有一些转录调控因子可能通过调节 *Cyp51A* 基因的表达水平而对唑类耐药产生影响,如甾醇调节元件结合蛋白家族的 *SrbA*^[30], CCAAT-序列结合转录因子复合体的亚基 *HapE*^[31],及具有细胞色素 b₅ 样亚铁血红素结合区域结构的损伤耐药蛋白家族(包括 *DapA*、*DapB* 和 *DapC*)等^[32]。与真菌应激反应和生物膜相关的耐药机制在临床菌株中非常少见,但有研究提示,与真菌应激适应密切相关的热休克蛋白 90(HSP90)^[33]、钙调神经磷酸酶^[34]及氧化应激反应相关的 YAP 蛋白^[35]可能在唑类药物耐药适应过程中也发挥了重要作用(图 2)。

三、唑类药物耐药产生的途径

目前研究认为烟曲霉对唑类药物耐药主要有两种途径^[36],一是临床曲霉病患者长期使用唑类药物,导致烟曲霉出现 *Cyp51A* 基因点突变(如 G54、M220 等)或其他机制介导的耐药;二是环境唑类杀真菌剂的筛选压力,导致 *Cyp51A* 基

因及上游启动子出现 TR₃₄/L98H、TR₄₆/Y121F/T289A 等突变,许多检出这两类突变株的患者从未使用过唑类药物治疗,而在医院和农业环境中也检出该类耐药株且高度同源^[37]。上述两种耐药性获得途径分别称为患者和环境获得性耐药途径,这两种途径正好对应患者体内和体外两种不同环境作用压力,两种耐药获得方式存在很大差异(表 1)^[12],这也提示体内和体外不同环境因素作用压力下烟曲霉耐药进化的分子机制可能存在很大差异。

目前针对患者获得性耐药途径的研究证据较为充分,而对于环境获得性耐药途径却存在很大争议。研究人员尝试在临床和农业唑类药物作用条件下利用敏感烟曲霉耐药诱导与进化实验,但却未获得 TR₃₄/L98H 与 TR₄₆/Y121F/T289A 突变株^[38-40],提示这两类耐药株可能难以通过诱导实验获得,或者并非是由于唑类药物作用压力下野生型烟曲霉发生基因突变所致。荷兰内梅亨大学的 Verweij 教授是环境获得性耐药途径的坚定支持者,主要是考虑到荷兰分离的超过 90% 的临床耐药株是由于 TR₃₄/L98H 突变所致,目前已在农



注:红色箭头是指较为明确的耐药机制,蓝色箭头是指可能存在的耐药机制

图 2 烟曲霉对唑类药物耐药的机制以及可能的调控通路

表 1 烟曲霉基于患者获得性和环境获得性耐药途径的特征差异^[12]

特征	患者获得性耐药	环境获得性耐药
疾病类型	慢性肺曲霉病或曲霉肿	所有的曲霉病,包括过敏性肺支气管曲霉病、急性曲霉病、囊性纤维化患者的曲霉定植
药物治疗史	所有的患者既往或目前正在接受唑类药物治疗	三分之二的患者没有唑类药物治疗史
患者结局	临床唑类药物治疗失败	临床唑类药物治疗失败
单一临床样本耐药机制种类	单一临床样本可出现多种耐药机制	大多数患者均出现 1 种耐药机制
微生物培养	培养时同时出现唑类药物敏感和耐药株	培养时同时出现唑类药物敏感和耐药株
耐药表型	对多种或全部唑类药物耐药	对多种或全部唑类药物耐药
主要耐药机制	<i>Cyp51A</i> 基因出现点突变,包括 G54、P216、M220、G138、Y431 和 G448 等,以及出现非 <i>Cyp51A</i> 介导的和未知的耐药机制	<i>Cyp51A</i> 基因及上游启动子出现 TR ₃₄ /L98H、TR ₅₃ 、TR ₄₆ /Y121F/T289A 等突变
耐药株遗传多样性	不同患者分离的耐药株具有高度遗传多样性	不同患者分离的耐药株遗传多样性低
适应性代偿特征	菌株可能出现异常的生长表型,产孢或生长能力下降	没有明显的适应性代偿

业土壤、堆肥等多种环境标本中分离出这种耐药株,许多农业使用的唑类药物与临床唑类药物具有非常类似的结构,而近年来农业唑类杀真菌剂的广泛使用为这种耐药机制的出现提供了筛选压力^[37,40]。2013 年欧洲 CDC 发布了一份有关环境唑类杀真菌剂使用对曲霉唑类耐药影响的评估报告,该报告指出,尽管支持环境耐药来源假说的证据在不断增加,其因果关联尚有待进一步证实^[3]。从一些流行病学调查结果来看,农业唑类药物的使用也不一定能诱导唑类耐药烟曲霉的出现或导致烟曲霉对唑类药物敏感性下降^[41-42]。瑞士巴塞尔大学的 Gisi^[43]通过风险评估分析发现,相对于农作物保护唑类杀真菌剂的使用,人类和动物间唑类药物使用对烟曲霉具有更高的耐药筛选风险,但唑类耐药孢子源自部分高筛选压力环境(如水果和种子处理、木材保护场所)的可能性也不能排除。

四、耐药株的遗传多样性与分子进化

针对烟曲霉的基因分型方法主要有微卫星分型、多位点序列分型(MLST)、细胞表面蛋白(CSP)分型等^[44-45],其中微卫星分型又称短串联重复序列(short tandem repeat, STR)分型,因其具有较高的分辨力和实验室之间重复性而被广泛应用^[46]。STR 分型结果显示,烟曲霉耐药突变株的遗传多样性虽然总体上比敏感株和其他耐药机制菌株要低,但是许多菌株的遗传背景仍然存在很大差异^[47-48]。与荷兰、中国、德国等国家 TR₃₄/L98H 突变株的高度多样性不同,印度的 TR₃₄/L98H 突变株呈现一种克隆播散的趋势,提示印度的突变株可能通过基因重组或突变导致其对各类环境具有更强的适应性^[16]。不过,Abdoulrasouli 等^[49]采取比较基因组学分析发现,荷兰、英国和印度国家的 TR₃₄/L98H 突变株均在发生重组,导致耐药菌株出现截然不同的遗传背景,虽然印度 TR₃₄/L98H 突变株的遗传多样性显著低于荷兰和英国,但其重组率最高。荷兰分离的 TR₄₆/Y121F/T289A 突变型临床烟曲霉菌株与 TR₃₄/L98H 突变株、敏感株分别属于不同的克隆群,提示其可能具有不同的进化来源^[13]。我们前期研究显示,我国分离的 TR₄₆/Y121F/T289A 突变株和部分 TR₃₄/L98H 突变株与国外的类似突变菌株有一定同源性,存在克隆传播的可能,但 TR₃₄/L98H/S297T/F495I 突变株与国外耐药株遗传背景差异较大,而与国内敏感株遗传背景接近,提示该类耐药株更可能是由敏感株进化而来^[19,24]。

无性产孢是烟曲霉在自然界广泛存在的一种生殖方式。荷兰瓦格宁根大学 Zhang 等^[50]通过进化实验研究发现,无性产孢提高了烟曲霉对唑类药物环境的适应能力。烟曲霉一直被认为是只能进行无性生殖的真菌,但是通过全基因组测序,研究人员发现了与有性生殖相关的基因结构。2009 年, O' Gorman 等^[51]发现具有互补交配型别(mating type)的烟曲霉在燕麦培养基中培养 6 个月后可发生有性生殖,随后 Sugui 等^[52]发现部分特殊配对的烟曲霉在 2 个月后即可完成有性生殖过程。Camps 等^[48]使用 TR₃₄/L98H 突变株与野生株进行有性生殖实验,发现其子囊孢子后代可获得 TR₃₄/L98H 突变基因型,并具有多样化的遗传背景,这提示有

性生殖可能也在 TR₃₄/L98H 突变烟曲霉的进化与传播过程中发挥了重要作用。荷兰研究人员通过对 255 株烟曲霉进行群体结构分析发现,唑类耐药株均归入其中一个以无性产孢为主要生殖模式的群体,而这可能是荷兰分离耐药株的主要播散和进化方式^[53]。

五、总结与展望

近年来,随着许多新型治疗手段的引入以及人口老龄化的不断加重,免疫抑制人群数量大量增加,导致住院患者曲霉病发病风险增加。但是目前曲霉病存在诊断率低、微生物送检率低、常规不开展曲霉菌药敏检测、治疗药物针对性不强等特点,免疫力低下人群一旦发生曲霉病,病死率常达 30% 以上,对患者健康与安全造成了巨大威胁。尤其是近年来三唑类药物耐药烟曲霉的检出不断增加,进一步加大了曲霉病治疗的难度,社会和经济负担巨大。为应对全世界范围内出现的烟曲霉耐药问题,有必要进一步加强临床和环境曲霉菌的耐药性调查与监测,开展曲霉病的规范诊治以及系列创新基础研究和新型抗真菌药物开发工作。

目前包括中国在内的许多发展中国家在曲霉菌耐药性监测方面的研究还存在很大不足,主要体现在缺乏系统性的耐药性国家或区域监测网络,尤其是针对环境烟曲霉监测不够,以及缺乏环境杀真菌剂使用方面的统计数据及其与烟曲霉对唑类药物耐药性之间关联方面的调查,导致无法为临床和农药唑类药物合理使用提供有针对性的指导建议。我国是唑类杀真菌剂生产和使用的农业大国,2010 年我国农业杀真菌剂占农药使用总量的 23%,每年三唑类杀真菌剂使用量高达 3 万吨^[54],远超过英国、荷兰等国的使用量,而针对农药杀真菌剂对烟曲霉耐药性产生影响的评估研究却极为缺乏。

不同医疗机构应当根据当地烟曲霉耐药性流行水平开展针对性曲霉病诊治工作,其中环境耐药机制菌株比例达到 10% 及以下的地区可视为“高流行地区”,应采取伏立康唑联合使用棘白霉素类或联合使用两性霉素 B 的方案作为侵袭性肺曲霉病经验治疗的优先方案^[36]。已有监测提示,我国临床烟曲霉唑类耐药检出率不足 10%,但不排除部分地区烟曲霉唑类药物耐药率偏高,因此有必要加强地区性耐药性监测,在未获得耐药性监测结果之前,应尽量加强针对唑类耐药烟曲霉感染的早期诊断和药敏检测,并根据药敏结果及时调整用药方案。

尽管烟曲霉耐药形势日益严峻,但是考虑到唑类药物在临床医学和农业作物保护方面的重要作用,仍需采取多种措施保持其有效性。近年来,随着多种组学技术、单细胞测序以及基因编辑技术的快速发展和可获得性的提高,“精准医疗”概念一经提出便迅速得到大家的认同和响应,唑类耐药相关的曲霉病如何开展精准防控也是一个值得思考的问题。Hagiwara 等^[55]通过对慢性曲霉病患者连续分离的多株烟曲霉进行全基因组测序,发现烟曲霉基因组可以在感染与治疗过程中发生动态变化,但并未阐明抗真菌药物治疗与基因组变化和耐药性产生之间的关联。由于烟曲霉基因组相对较大(约为金黄色葡萄球菌的 10 倍),目前公开的基因组、

转录组和蛋白组数据很少,导致无法开展基于大数据的分析。随着测序成本的下降,烟曲霉的组学数据有望在未来5~10年呈现指数级增加,利用这些数据,结合基因编辑技术,有助于研究烟曲霉耐药产生的深层次原因,阐明相应的调控网络,揭示耐药株的进化与播散规律,发现疾病诊断治疗相关的关键标志物,为唑类耐药曲霉感染的精准防控提供依据。同时,针对临床标本的快速基因组测序分析有望大幅缩短曲霉病诊断的时限,提高耐药株的诊断率,为早期科学用药提供可能,对切实提升医疗安全与水平、降低曲霉病带来的社会和经济负担具有重要意义。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Garcia-Vidal C, Peghin M, Cervera C, et al. Causes of death in a contemporary cohort of patients with invasive aspergillosis [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120370. DOI: 10.1371/journal.pone.0120370.
- [2] Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001–2010 [J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(7): 1149–1156. DOI: 10.3201/eid2007.140087.
- [3] European Centre for Disease Prevention and Control. Risk assessment on the impact of environmental usage of triazoles on the development and spread of resistance to medical triazoles in *Aspergillus* species [R]. Stockholm: ECDC, 2013. DOI: 10.2900/76274.
- [4] Zhu LP, Wu JQ, Perlin DS, et al. Burden of serious fungal infections in China//23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases [C]. 2013.
- [5] Erjavec Z, Kluin-Nelemans H, Verweij PE. Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis [J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15(7): 625–633. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02929.x.
- [6] Lamoth F, Juvvadi PR, Steinbach WJ. Editorial: advances in *Aspergillus fumigatus* pathobiology [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 43. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00043.
- [7] Vermeulen E, Lagrou K, Verweij PE. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a growing public health concern [J]. Curr Opin Infect Dis, 2013, 26(6): 493–500. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000005.
- [8] Lestrade PPA, Meis JF, Arends JP, et al. Diagnosis and management of aspergillosis in the Netherlands: a national survey [J]. Mycoses, 2016, 59(2): 101–107. DOI: 10.1111/myc.12440.
- [9] Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38–A2 document) [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(9): 3251–3257. DOI: 10.1128/JCM.00536–10.
- [10] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antifungal agents breakpoint tables for interpretation of MICs Version 8.0 [EB/OL]. (2015–11–16) [2016–05–06]. <http://www.eucast.org>.
- [11] Lelièvre L, Groh M, Angebault C, et al. Azole resistant *Aspergillus fumigatus*: an emerging problem [J]. Méd Mal Infect, 2013, 43(4): 139–145. DOI: 10.1016/j.medmal.2013.02.010.
- [12] Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJG, et al. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? [J]. Clin Infect Dis, 2016, 62(3): 362–368. DOI: 10.1093/cid/civ885.
- [13] van der Linden JW, Camps SMT, Kampinga GA, et al. Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles [J]. Clin Infect Dis, 2013, 57(4): 513–520. DOI: 10.1093/cid/cit320.
- [14] Führen J, Voskuil WS, Boel CHE, et al. High prevalence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from high-risk patients [J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(10): 2894–2898. DOI: 10.1093/jac/dkv177.
- [15] Bueid A, Howard SJ, Moore CB, et al. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009 [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(10): 2116–2118. DOI: 10.1093/jac/dkq279.
- [16] Chowdhary A, Kathuria S, Xu JP, et al. Clonal expansion and emergence of environmental multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR₃₄/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52871. DOI: 10.1371/journal.pone.0052871.
- [17] Chen J, Li HM, Li RY, et al. Mutations in the *cyp51A* gene and susceptibility to itraconazole in *Aspergillus fumigatus* serially isolated from a patient with lung aspergilloma [J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 55(1): 31–37. DOI: 10.1093/jac/dkh507.
- [18] Liu MS, Zeng R, Zhang LL, et al. Multiple *cyp51A*-based mechanisms identified in azole-resistant isolates of *Aspergillus fumigatus* from China [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(7): 4321–4325. DOI: 10.1128/AAC.00003–15.
- [19] Chen Y, Lu Z, Zhao J, et al. Epidemiology and molecular characterizations of azole resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* from China [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016. DOI: 10.1128/AAC.01005–16.
- [20] Chowdhary A, Sharma C, Hagen F, et al. Exploring azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* with special reference to resistance mechanisms [J]. Future Microbiol, 2014, 9: 697–711. DOI: 10.2217/fmb.14.27.
- [21] Mellado E, Garcia-Effron G, Alcázar-Fuoli L, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(6): 1897–1904. DOI: 10.1128/AAC.01092–06.
- [22] Verweij PE, Mellado E, Melchers WJ. Multiple-triazole-resistant aspergillosis [J]. N Engl J Med, 2007, 356(14): 1481–1483. DOI: 10.1056/NEJMc061720.
- [23] Camps SMT, van der Linden JWM, Melchers WJG, et al. A new resistance mechanism emerging in clinical *Aspergillus fumigatus* isolates in The Netherlands//5th TIMM [C]. Valencia, Spain, 2011.
- [24] Chen Y, Wang H, Lu ZY, et al. Emergence of TR₃₄/Y121F/T289A in an *Aspergillus fumigatus* isolate from a Chinese patient [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(11): 7148–7150. DOI: 10.1128/AAC.00887–15.
- [25] Marie C, White TC. Genetic basis of antifungal drug resistance [J]. Curr Fungal Infect Rep, 2009, 3(3): 163–169. DOI: 10.1007/s12281-009-0021-y.
- [26] Rajendran R, Mowat E, McCulloch E, et al. Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(5): 2092–2097. DOI: 10.1128/AAC.01189–10.
- [27] Slaven JW, Anderson MJ, Sanglard D, et al. Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, *atrF*, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate [J]. Fungal Genet Biol, 2002, 36(3):

- 199–206.
- [28] Fraczek MG, Bromley M, Buied A, et al. The *cdr1B* efflux transporter is associated with non-*cyp51A*-mediated itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* [J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(7): 1486–1496. DOI: 10.1093/jac/dkt075.
- [29] Meneau I, Coste AT, Sanglard D. Identification of *Aspergillus fumigatus* multidrug transporter genes and their potential involvement in antifungal resistance [J]. Med Mycol, 2016, 54(6): 616–627. DOI: 10.1093/mmy/myw005.
- [30] Blatzer M, Barker BM, Willger SD, et al. SREBP coordinates iron and ergosterol homeostasis to mediate triazole drug and hypoxia responses in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* [J]. PLoS Genet, 2011, 7(12): e1002374. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002374.
- [31] Camps SMT, Dutilh BE, Arendrup MC, et al. Discovery of a HapE mutation that causes azole resistance in *Aspergillus fumigatus* through whole genome sequencing and sexual crossing [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50034. DOI: 10.1371/journal.pone.0050034.
- [32] Song J, Zhai P, Zhang Y, et al. The *Aspergillus fumigatus* damage resistance protein family coordinately regulates ergosterol biosynthesis and azole susceptibility [J]. mBio, 2016, 7(1): e01919–15. DOI: 10.1128/mBio.01919–15.
- [33] Lamoth F, Juvvadi PR, Soderblom EJ, et al. Identification of a key lysine residue in heat shock protein 90 required for azole and echinocandin resistance in *Aspergillus fumigatus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(4): 1889–1896. DOI: 10.1128/AAC.02286–13.
- [34] Lamoth F, Juvvadi PR, Gehrke C, et al. *In vitro* activity of calcineurin and heat shock protein 90 inhibitors against *Aspergillus fumigatus* azole- and echinocandin-resistant strains [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(2): 1035–1039. DOI: 10.1128/AAC.01857–12.
- [35] Qiao JJ, Liu W, Li RY. Truncated *Afyap1* attenuates antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to voriconazole and confers adaptation of the fungus to oxidative stress [J]. Mycopathologia, 2010, 170(3): 155–160. DOI: 10.1007/s11046-010-9309-2.
- [36] Verweij PE, Ananda-Rajah M, Andes D, et al. International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus* [J]. Drug Resist Updat, 2015, 21–22: 30–40. DOI: 10.1016/j.drup.2015.08.001.
- [37] Verweij PE, Snelders E, Kema GHJ, et al. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? [J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9(12): 789–795. DOI: 10.1016/S1473-3099(09)70265–8.
- [38] Nascimento AM, Goldman GH, Park S, et al. Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(5): 1719–1726. DOI: 10.1128/AAC.47.5.1719–1726.2003.
- [39] da Silva Ferreira ME, Capellaro JL, dos Reis Marques E, et al. In vitro evolution of itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* involves multiple mechanisms of resistance [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(11): 4405–4413. DOI: 10.1128/AAC.48.11.4405–4413.2004.
- [40] Snelders E, Camps SM, Karawajczyk A, et al. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus* [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e31801. DOI: 10.1371/journal.pone.0031801.
- [41] Kano R, Kohata E, Tateishi A, et al. Does farm fungicide use induce azole resistance in *Aspergillus fumigatus*? [J]. Med Mycol, 2015, 53(2): 174–177. DOI: 10.1093/mmy/myu076.
- [42] Lago M, Aguiar A, Natário A, et al. Does fungicide application in vineyards induce resistance to medical azoles in *Aspergillus* species? [J]. Environ Monit Assess, 2014, 186(9): 5581–5593. DOI: 10.1007/s10661-014-3804–8.
- [43] Gisi U. Assessment of selection and resistance risk for demethylation inhibitor fungicides in *Aspergillus fumigatus* in agriculture and medicine: a critical review [J]. Pest Manag Sci, 2014, 70(3): 352–364. DOI: 10.1002/ps.3664.
- [44] Vanhee LME, Symoens F, Jacobsen MD, et al. Comparison of multiple typing methods for *Aspergillus fumigatus* [J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15(7): 643–650. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02844.x.
- [45] Kidd SE, Nik Zulkepli NAA, Slavin MA, et al. Utility of a proposed CSP typing nomenclature for Australian *Aspergillus fumigatus* isolates: identification of additional CSP types and suggested modifications [J]. J Microbiol Methods, 2009, 78(2): 223–226. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.06.003.
- [46] de Valk HA, Meis JFGM, Klaassen CHW. Microsatellite based typing of *Aspergillus fumigatus*: strengths, pitfalls and solutions [J]. J Microbiol Methods, 2007, 69(2): 268–272. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.01.009.
- [47] Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism [J]. PLoS Med, 2008, 5(11): e219. DOI: 10.1371/journal.pmed.0050219.
- [48] Camps SMT, Rijs AJMM, Klaassen CHW, et al. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates harboring the TR₃₄/L98H azole resistance mechanism [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(8): 2674–2680. DOI: 10.1128/JCM.00335–12.
- [49] Abdolrasouli A, Rhodes J, Beale MA, et al. Genomic context of azole resistance mutations in *Aspergillus fumigatus* determined using whole-genome sequencing [J]. mBio, 2015, 6(3): e00536. DOI: 10.1128/mBio.00536–15.
- [50] Zhang JH, Debets AJ, Verweij PE, et al. Asexual sporulation facilitates adaptation: the emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* [J]. Evolution, 2015, 69(10): 2573–2586. DOI: 10.1111/evo.12763.
- [51] O’Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* [J]. Nature, 2009, 457(7228): 471–474. DOI: 10.1038/nature07528.
- [52] Sugui JA, Losada L, Wang W, et al. Identification and characterization of an *Aspergillus fumigatus* “supermater” pair [J]. mBio, 2011, 2(6): e00234–11. DOI: 10.1128/mBio.00234–11.
- [53] Klaassen CH, Gibbons JG, Fedorova ND, et al. Evidence for genetic differentiation and variable recombination rates among Dutch populations of the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus* [J]. Mol Ecol, 2012, 21(1): 57–70. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05364.x.
- [54] 王志飞. 杀菌剂市场概况及未来发展趋势 [J]. 农药市场信息, 2012(6): 22–23. DOI: 10.13378/j.cnki.pmn.2012.06.030.
Wang ZF. The status of fungicide market and its future trends [J]. Pest Market News, 2012(6): 22–23. DOI: 10.13378/j.cnki.pmn.2012.06.030.
- [55] Hagiwara D, Takahashi H, Watanabe A, et al. Whole-genome comparison of *Aspergillus fumigatus* strains serially isolated from patients with aspergillosis [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(12): 4202–4209. DOI: 10.1128/JCM.01105–14.

(收稿日期: 2016–07–28)

(本文编辑: 王岚)