

病原真菌基因组流行病学研究进展

钟涵莹^{1,2} 李定辰¹ 陈芳艳¹ 赵静雅¹ 许蕊^{1,2} 韩黎¹

¹中国人民解放军疾病预防控制中心,北京 100071;²中国医科大学公共卫生学院,沈阳 110122

通信作者:韩黎,Email:hanlicdc@163.com

【摘要】 基因组流行病学研究为病原真菌的遗传进化、传播和表型研究提供了新的视角,其核心技术是全基因组测序技术和生物信息学分析,极大地弥补了传统分子分型技术的不足。通过将病原真菌的全部遗传信息和流行病学调查相结合,能够预测病原真菌的传播途径和传播风险,为制定真菌防控的公共卫生策略提供理论基础。本文将对分子流行病学、基因组流行病学的发展以及基因组流行病学在病原真菌的遗传关系、溯源及进化、耐药性以及毒力、全基因组关联分析等方面的应用进行综述,并对病原真菌基因组流行病学未来发展做出展望。

【关键词】 基因组流行病学; 病原真菌; 全基因组测序; 全基因组关联分析

基金项目:国家自然科学基金(81971914,81772163);辽宁省自然科学基金(20180550255)

Progress in research of genomic epidemiology of pathogenic fungi

Zhong Hanying^{1,2}, Li Dingchen¹, Chen Fangyan¹, Zhao Jingya¹, Xu Rui^{1,2}, Han Li¹

¹Chinese People's Liberation Army Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100071, China;

²School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110122, China

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

【Abstract】 Genomic epidemiology, based on whole-genome sequencing technology and bioinformatics analysis, can make up for the shortcomings of traditional molecular typing methods and provide a novel insight for the genetic evolution and transmission of pathogenic fungi. The combination of genetic information and epidemiological methods of pathogenic fungi can predict fungi transmission routes and risks, and provide a theoretical basis for the development of public health strategies for fungi infection prevention and control. This paper summarizes the development of molecular epidemiology and genomic epidemiology, as well as the application of genomic epidemiology methods in the analyses of genetic relationship, origin, evolution, drug resistance, virulence, and genome-wide association of pathogenic fungi, and discusses the development of pathogenic fungi genomic epidemiology.

【Key words】 Genomic epidemiology; Pathogenic fungi; Whole-genome sequencing; Genome-wide associated study

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81971914, 81772163); Natural Science Foundation of Liaoning Province (20180550255)

病原真菌危害着人类的健康,当人体免疫功能低下时,真菌会侵袭人体引起不同程度真菌感染,主要的致病真菌有念珠菌、隐球菌、曲霉、毛霉等^[1]。真菌侵袭性感染所致疾病的死亡率较高,并且因感染部位、潜在的疾病和使用抗

真菌药物的情况而异^[2]。随着二代测序(next-generation sequencing, NGS)的出现,病原微生物的研究进入一个新的阶段,部分传统的分子分型方法被基于基因组学的技术方法所取代^[3-4]。全基因组分析方法与流行病学调查相结合,

DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20211015-00794

收稿日期 2021-10-15 本文编辑 万玉立

引用格式:钟涵莹,李定辰,陈芳艳,等.病原真菌基因组流行病学研究进展[J].中华流行病学杂志,2022,43(6):981-986. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20211015-00794.

Zhong HY, Li DC, Chen FY, et al. Progress in research of genomic epidemiology of pathogenic fungi[J]. Chin J Epidemiol, 2022, 43(6):981-986. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20211015-00794.



形成了基因组流行病学研究的主要技术框架^[5]。基因组流行病学在病毒研究中可以用来监测病毒的暴发以及起源,在多种细菌特别是结核分枝杆菌的研究中也已得到广泛应用,但在真菌中的发展仍处于起步阶段^[6-8]。

一、基因组流行病学概述

1. 分子流行病学:是从分子水平上,运用分子生物学技术进行基因分型,结合流行病学方法,以寻找不同菌株的关联性、传播途径、耐药性以及分子机制等为研究科学目标^[9]。20 世纪 90 年代之前的分子流行病学分型方法,如 PFGE、限制性片段长度多态性分析、扩增片段长度多态性分析、单链构象多态性分析、随机引物扩增 DNA 多态性分析等技术,各有特点,也各有一些局限性^[10]。其中大多数的分型方法都存在着分辨率不高、实验重复性差、稳定性差等特点。

分子流行病学的技术在不断改进,逐渐转变为更适用的方法,如现在比较常用的微卫星分型方法以及多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)^[11]。MLST 和微卫星长度多态性(MLP)两种方法相对于传统的分子分型方法分辨率更高,鉴别力更强,已经广泛应用于许多真菌的分子流行病学研究^[12-17]。MLP 是对真核生物基因组中多个位点的短串联重复序列的扩增,能够进行菌株基因分型以及评估不同分离株的遗传相关性。MLST 是一种通过对微生物特定管家基因片段进行扩增、测序、并分析的一种基因分型方法^[18]。MLST 和 MLP 等分型方法虽然操作简单,对 DNA 质量要求不高,但都只是基于基因组部分序列,且分辨率有限,无法非常准确地阐释菌株之间的遗传变异与关系^[19]。

2. 基因组流行病学:由新的测序技术以及相关的生物信息学分析所构成,全基因组分析方法与流行病学调查相结合^[20],以阐释病原体的鉴定、进化溯源、变异、系统发育等问题。全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)是一个功能强大、高分辨率的工具,可用于菌株的种群结构分析、系统地理学和耐药性相关的突变等研究中^[21-23],为真菌感染疾病流行病学的调查和监测提供了先进可行的解决方案^[10]。随着二代和三代测序技术引入,能够实现病原微生物整个基因组的全覆盖实时测序。分析病原体之间单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)的差异是比较基因组的最常见方法,可以通过全基因组数据的组装拼接获得大量 SNP,并与病原微生物的参考基因组做比较,已用于各种系统发育研究和全基因组关联研究(genome-wide associated study, GWAS)中^[24]。基于整个基因组序列,不仅可以定位和描述引起疫情暴发的病原体,还可以了解疫情以及病原体的起源和动态流行情况^[25],更好地预测其风险并制定科学的干预措施。

3. WGS 发展:WGS 优势在于大大降低了每个碱基对的测序成本,可以获得大量数据,从而与传统分型方法(如 PFGE 或 MLST)相比以更低廉的价格进行测序^[26],并且相较于其他分子分型技术有更高的鉴别能力^[27]。基因测序技术的历史可以分为 3 个阶段:第一代、第二代和第三代测

序^[28]。第一代测序方法通量低、耗时长、操作复杂、成本高,现已不是 WGS 的主流方法,但由于其准确性高,仍是基因组测序确认的金标准。NGS 是现阶段应用较广的测序方法,包括采用边合成边测序策略的 Illumina 平台、离子半导体测序平台和新研发的纳米球测序平台等^[29-30]。第三代测序技术也叫单分子测序技术,如基于纳米孔的单分子测序,以单分子 DNA 通过生物纳米孔的电流变化读取核酸上碱基序列为技术核心^[31-32],适用于大基因组和复杂基因组分析。WGS 制备样本和生成序列所需的时间较长,生物信息学分析较为复杂,这些对基因组流行病学的发展来说是一个挑战。

二、基因组流行病学研究领域

1. 系统发育分析:可以帮助推断病原体可能的传播途径和地理路径,以及毒力或耐药性是如何随着时间的推移而发展^[33-34]。系统发育分析包括构建、评估和解读进化树,推断出来的进化关系一般用进化树来表示。建立进化树的主要方法可以分为 4 类:简约法、最大似然法、贝叶斯法和距离法^[35],前 3 类方法是 WGS 研究中最常用的方法。基于全基因组的系统发育分析可以用来确定菌株可能的传播途径,并在全球范围内推断这些分离株的遗传起源^[36]。

2. GWAS:用于描述整个基因组中遗传变异,通常是基于 SNP,结合统计学分析重要遗传突变位点和表型的关联,获得对表型背后的生物学机制新的见解^[37-38]。在过去的 10 年中,GWAS 在人类复杂疾病的研究中已经取得了显著的进步,已成功定位了大量人类的疾病中具有遗传风险的变异位点^[39]。人类 GWAS 的快速发展为微生物 GWAS 提供了乐观的前景,为耐药性、宿主适应性、毒力等复杂表型的遗传变异研究提供新的角度,加深对遗传、进化和传播的认识^[40]。

三、基因组流行病学在病原真菌中的应用

1. 遗传多样性:分离株之间的遗传多样性可用于解释许多不同的方面,例如菌株遗传谱系、菌株毒力因子、特异性毒力表型、参与抗真菌耐药性发展的潜在因素,更为常见的是流行病学监测和暴发研究中的遗传菌株相关性^[41-43]。

(1) 遗传谱系及亲缘关系:耳念珠菌(*Candida auris*)的出现成了公共卫生中的一大威胁^[44]。对来自不同地区耳念珠菌分离株进行全基因组的系统发育分析,揭示了 4 个主要遗传分支,这些分支通过最初公布此菌株的地理区域来命名(南亚、东南亚、非洲、南美洲地区)^[45],最新研究发现了第五个分支,伊朗的分离株,这 5 个主要分支之间相隔数万个 SNP,但是同一分支内的分离株之间变异很小^[46]。基于 SNP 的系统发育分析能够揭示分离株的来源分支,同一地区的流行病学调查显示菌株遗传高度相关性,表明存在本地传播链的可能^[47-49]。但是也有报道,在德国、英国和美国这些国家内有来自不同分支的分离菌株,说明可能是从不同国家或地区多次传入,然后在本地传播,例如德国暴发病例的分离株具有独立的遗传背景,排除了患者之间存在传播的可能性^[50-52]。

新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)的基因组研究已经证明了此物种存在巨大的系统发育多样性^[53]。种群基因分析认为,新生隐球菌起源于南美洲地区^[54-55],有 3 个谱系(VNI、VNI I 和 VNB)。格特隐球菌(*Cryptococcus gattii*)起初被认为是新生隐球菌的变种,现已单独分离为一个真菌物种^[56],主要分为 4 个谱系(VG I、VG II、VG III 和 VG IV)^[57]。

烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)是常见的人类致病性真菌^[58]。Abdolrasouli 等^[41]对来源于英国、荷兰和印度的 22 个烟曲霉分离菌株进行全基因组 SNP 的系统发育分析,结果表明,所有印度分离株彼此之间的相关性非常高,比来自荷兰或英国的分离株相关性要高得多,地理位置和分离株的基因型之间没有明显的关系;并且发现虽然印度分离株地理位置分布广,但是遗传多样性低于欧洲地区的分离菌株。

荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)能够引起组织胞浆病^[59]。Sepúlveda 等^[60]在组织胞浆病流行的 4 个地区对 30 株组织胞浆菌进行 WGS,通过全基因组种群遗传学以及系统发育分析,确定了组织胞浆菌属由 5 个谱系组成,其中 4 个被定义为新物种。

(2) 耐药性产生与演化:全基因组分析抗真菌药物耐药性,可以揭示不同抗菌药物的耐药性相关遗传突变,使预测真菌菌株耐药性成为可能^[61-62]。了解真菌耐药性的形成与传播也能够给找到耐药暴发事件的来源提供线索^[34]。

Maphanga 等^[63]对 54 株来源于 4 个分支的耳念珠菌临床菌株进行全基因组分析发现,所有菌株的靶基因 *Erg11* 均发生了氨基酸突变,其中有 3 个突变热点,并且这 3 个突变热点与地理分支存在相关性。这说明不同地理来源耳念珠菌的耐药性是进化获得的,根据应用的药物,不同进化的菌株发展出不同的交叉耐药模式^[64-65]。在同为念珠菌属的白色念珠菌(*Candida albicans*)的一项研究中^[64],作者对临床患者连续分离(同一患者患病中不同时间的分离株)的白色念珠菌进行了全基因组分析,与最初的敏感分离株相比多了 4 610 个非同义 SNP,并确定了一些可能与耐药有关的基因。

Etienne 等^[66]开展烟曲霉唑类药物耐药菌株实验,对来自美国的 174 株以及荷兰、印度、英国的 16 株烟曲霉进行基于全基因组 SNP 的分析研究,确定了美国烟曲霉遗传背景不同的两个种群,分为不同的进化支(A、B),发现美国的 TR₃₄/L98H 耐药突变株形成单独的进化支 A,与印度、荷兰和英国的耐药突变株可能有共同的起源;其中有 6% 的耐药菌株在两个进化支均有分布,这可能是耐药菌株和敏感菌株的基因重组所致。

烟曲霉耐药机制的研究主要集中在 *CYP51A* 基因上,TR₃₄/L98H 这一突变类型也属于 *CYP51A* 基因突变所致。在 Bueid 等^[67]的研究中 46% 的耐药烟曲霉菌株与 *CYP51A* 基因突变无关。所以 Sharma 等^[68]对无 *CYP51A* 突变的烟曲霉分离株进行全基因组分析,鉴别出 *HMGI* 基因中与耐药相关的突变位点;Losada 等^[69]通过药敏实验选择菌株,进行交配传代培养,对得到的后代耐药菌株 WGS 分析,发现了 5 个基

因导致了烟曲霉的唑类耐药,这些研究都表明存在除了 *CYP51A* 基因所介导耐药之外的耐药机制。

Fan 等^[70]采用 WGS,得到了来自 11 个国家的 196 个烟曲霉菌株的全基因组序列。研究了与两性霉素 B(amphotericin B, AMB)耐药性相关的潜在基因和突变,并探究了遗传群体 AMB 耐药性的分布。通过全基因组水平 SNP 分析表明,这些菌株在系统发育树上属于 3 个不同的遗传簇,90% 耐药株位于同一个簇上;并且确定有超过 60 个 SNP 与 AMB 耐药性显著相关。

(3) 毒力:毒力表型的变化取决于分离株来源,基因组数据可以揭示致病力潜在的决定因素。Puértolas-Balint 等^[71]假设不同来源的菌株可能会有不同的毒力遗传背景,调查了 9 株烟曲霉的 244 个毒力相关基因,使用基因组分析来评估潜在的毒力因子,认为这些烟曲霉分离菌株都有相似的毒力相关遗传信息。Chatterjee 等^[72]对耳念珠菌的全基因组做了一个概述,与白色念珠菌基因组比较,发现两者有相似的毒力特征,并且解释了其潜在致病力相关的毒力因子。伊蒙菌(*Emmonsia*)是一种罕见的病原真菌[伊蒙菌属现已取消,剩余物种被划入伊麦角菌属(*Emergomycetes*)],可导致严重的肺部疾病^[73-74]。在 Yang 等^[75]的研究中,通过全基因组序列分析对新种伊蒙菌(*Emmonsia sp. 5z489*)的进化关系以及毒力因子进行分析,推测与致病力相关的毒力因子,为这种罕见的真菌病原体的致病分子机制提供了研究基础。

2. GWAS 应用:GWAS 旨在通过表型与基因型关联分析,找到与表型关联的基因型,并且通过试验证明,分析相关的遗传机制。GWAS 在病原真菌中的应用还比较少,目前主要围绕毒力与耐药性这两种表型研究。

Desjardins 等^[76]对新生隐球菌开展了 GWAS 分析,发现了 10 个与毒力相关的位点,鉴定出参与酵母-菌丝状态转化的基因 *RZE1* 与新生隐球菌毒力相关,发现转录因子 BZP4 中功能丧失突变与许多分离株的黑化相关。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是一种低毒力的条件性致病菌,Muller 等^[77]收集了 44 株临床菌株和 44 株非临床菌株进行 GWAS 的研究,发现了与酿酒酵母致病力有关的基因。Fan 等^[78]分析了来自 12 个国家的 195 株烟曲霉菌株,通过 GWAS 确定了与伊曲康唑耐药性显著相关的 6 个错义突变和与伏立康唑耐药性显著相关的 18 个错义突变。发现唑类药物耐药相关的新突变应有助于进一步研究其耐药分子机制。

四、总结与展望

测序成本的下降和高通量基因组测序技术的不断改进,将继续推动分子基因型流行病学到基因组流行病学的前进。通过基于 WGS 的系统发育分析以及 GWAS 分析,能够了解菌株间的遗传背景,例如菌株起源、菌株之间传播链、不同地区菌株的亲缘关系等,阐明病原真菌系统进化,把真菌的分型和表型相联系,得以掌握真菌流行分布、流行趋势、致病或耐药分子机制等。基于以上基因组流行病学

分析,可为真菌的后续研究、疾病诊断、抗真菌药物的研发策略、流行传播防控等提供科学的理论依据。

现有研究都说明了 GWAS 是识别耐药性和毒力相关基因的有力工具。GWAS 在真菌中尤其是人类致病真菌中的研究还很少见,其分析需要大量的样本量,并且由于生物的复杂性,研究生物学特征与基因组特征的关联也存在一定难度,还需要研究人员具有较高的生物信息学分析能力。所以加快发展高通量技术和适用于真菌基因组分析的新技术,并且运用于病原真菌研究中,将会大大推动病原真菌基因组流行病学这一领域的快速发展。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参 考 文 献

- [1] Köhler JR, Hube B, Puccia R, et al. Fungi that infect humans[J]. *Microbiol Spectr*, 2017, 5(3). DOI: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0014-2016.
- [2] Enoch DA, Yang HN, Aliyu SH, et al. The changing epidemiology of invasive fungal infections[M]//Lion T. Human fungal pathogen identification. New York:Humana Press, 2017:17-65. DOI:10.1007/978-1-4939-6515-1_2.
- [3] Grover A, Sharma P. Development and use of molecular markers: past and present[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2016, 36(2):290-302. DOI:10.3109/07388551.2014.959891.
- [4] Hong N, Chen M, Xu JP. Molecular markers reveal epidemiological patterns and evolutionary histories of the human pathogenic *Cryptococcus*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11:398. DOI:10.3389/fcimb.2021.683670.
- [5] Pallen MJ. Bacterial genomes for the masses[M]//Woodford N, Johnson AP. Genomics, proteomics, and clinical bacteriology. Totowa: Humana Press, 2004: 3-15 DOI:10.1385/1-59259-763-7.
- [6] Cohen KA, Manson AL, Desjardins CA, et al. Deciphering drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using whole-genome sequencing: progress, promise, and challenges[J]. *Genome Med*, 2019, 11(1):45. DOI:10.1186/s13073-019-0660-8.
- [7] Hawken SE, Snitkin ES. Genomic epidemiology of multidrug-resistant Gram-negative organisms[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2019, 1435(1):39-56. DOI:10.1111/nyas.13672.
- [8] Kim WK, Cho S, Lee SH, et al. Genomic epidemiology and active surveillance to investigate outbreaks of hantaviruses[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 10:803. DOI:10.3389/fcimb.2020.532388.
- [9] Blanton RE. Population genetics and molecular epidemiology of eukaryotes[J]. *Microbiol Spectr*, 2018, 6(6):1-29. DOI:10.1128/microbiolspec.AME-0002-2018.
- [10] Alanio A, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, et al. Investigating clinical issues by genotyping of medically important fungi: why and how? [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2017, 30(3):671-707. DOI:10.1128/CMR.00043-16.
- [11] Struelens M, Brisse S. From molecular to genomic epidemiology: transforming surveillance and control of infectious diseases[J]. *Euro Surveill*, 2013, 18(4): 20386. DOI:10.2807/ese.18.04.20386-en.
- [12] Gits-Muselli M, Campagne P, Desnos-Ollivier M, et al. Comparison of MultiLocus Sequence Typing (MLST) and Microsatellite Length Polymorphism (MLP) for *Pneumocystis jirovecii* genotyping[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020, 18: 2890-2896. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.10.005.
- [13] Garcia-Hermoso D, Desnos-Ollivier M, Bretagne S. Typing *Candida* species using microsatellite length polymorphism and multilocus sequence typing[M]//Calderone R, Cihlar R. *Candida* species. New York: Springer, 2016:199-214. DOI:10.1007/978-1-4939-3052-4.
- [14] Nyuykonge B, Eadie K, Zandijk WH, et al. A Short-Tandem-Repeat Assay (Mmy STR) for studying genetic variation in *Madurella mycetomatis*[J]. *J Clin Microbiol*, 2021, 59(3): e02331-20. DOI: 10.1128/JCM.02331-20.
- [15] van der Torre MH, Shen H, Rautemaa-Richardson R, et al. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* in chronic pulmonary aspergillosis patients[J]. *J Fungi*, 2021, 7(2):152. DOI:10.3390/jof7020152.
- [16] Gupta C, Jongman M, Das S, et al. Genotyping and in vitro antifungal susceptibility testing of *Fusarium* isolates from onychomycosis in India[J]. *Mycopathologia*, 2016, 181(7): 497-504. DOI:10.1007/s11046-016-0014-7.
- [17] Jin L, Cao JR, Xue XY, et al. Clinical and microbiological characteristics of *Cryptococcus gattii* isolated from 7 hospitals in China[J]. *BMC Microbiol*, 2020, 20(1):73. DOI: 10.1186/s12866-020-01752-4.
- [18] Taylor JW, Fisher MC. Fungal multilocus sequence typing —it's not just for bacteria[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6(4):351-356. DOI:10.1016/s1369-5274(03)00088-2.
- [19] Montoya MC, Magwene PM, Perfect JR. Associations between *Cryptococcus* genotypes, phenotypes, and clinical parameters of human disease:a review[J]. *J Fungi*, 2021, 7(4):260. DOI:10.3390/jof7040260.
- [20] de Viedma DG. Pathways and strategies followed in the genomic epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Infect Genet Evolut*, 2019, 72:4-9. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.01.027.
- [21] Reuter S, Ellington MJ, Cartwright EJP, et al. Rapid bacterial whole-genome sequencing to enhance diagnostic and public health microbiology[J]. *JAMA Intern Med*, 2013, 173(15):1397-1404. DOI:10.1001/jamainternmed.2013.7734.
- [22] Tagini F, Greub G. Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017, 36(11): 2007-2020. DOI: 10.1007/s10096-017-3024-6.
- [23] Brown AC, Christiansen MT. Whole-genome sequencing of *Chlamydia trachomatis* directly from human samples [M]//Brown AC. *Chlamydia trachomatis*. New York: Humana, 2019, 2042: 45-67. DOI: 10.1007/978-1-4939-9694-0_6.
- [24] Olson ND, Lund SP, Colman RE, et al. Best practices for evaluating single nucleotide variant calling methods for microbial genomics[J]. *Front Genet*, 2015, 6: 235. DOI: 10.3389/fgene.2015.00235.
- [25] Tang P, Croxen MA, Hasan MR, et al. Infection control in the new age of genomic epidemiology[J]. *Am J Infect Control*, 2017, 45(2): 170-179. DOI: 10.1016/j.ajic.2016.05.015.
- [26] Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and

- epidemiological surveillance[J]. Euro Surveill, 2013, 18(4):20380. DOI:10.2807/ese.18.04.20380-en.
- [27] Kwong JC, Mercouliou K, Tomita T, et al. Prospective whole-genome sequencing enhances national surveillance of *Listeria monocytogenes*[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(2):333-342. DOI:10.1128/JCM.02344-15.
- [28] Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA[J]. Genomics, 2016, 107(1): 1-8. DOI:10.1016/j.ygeno.2015.11.003.
- [29] Merriman B, Ion Torrent R&D Team, Rothberg JM. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing[J]. Electrophoresis, 2012, 33(23):3397-3417. DOI:10.1002/elps.201200424.
- [30] Huang J, Liang XM, Xuan YK, et al. A reference human genome dataset of the BGISEQ-500 sequencer[J]. GigaScience, 2017, 6(5): gix024. DOI: 10.1093/gigascience/gix024.
- [31] Ardui S, Ameer A, Vermeesch JR, et al. Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(5):2159-2168. DOI:10.1093/nar/gky066.
- [32] Lu HY, Giordano F, Ning ZM. Oxford Nanopore MinION sequencing and genome assembly[J]. Genom Proteom Bioinform, 2016, 14(5): 265-279. DOI: 10.1016/j.gpb.2016.05.004.
- [33] Aoun M, Kolmer JA, Breiland M, et al. Genotyping-by-sequencing for the study of genetic diversity in *Puccinia triticina*[J]. Plant Dis, 2020, 104(3): 752-760. DOI: 10.1094/PDIS-09-19-1890-RE.
- [34] Edwards HM, Rhodes J. Accounting for the biological complexity of pathogenic fungi in phylogenetic dating[J]. J Fungi, 2021, 7(8):661. DOI:10.3390/jof7080661.
- [35] Deng X, den Bakker HC, Hendriksen RS. Genomic epidemiology: whole-genome-sequencing-powered surveillance and outbreak investigation of foodborne bacterial pathogens[J]. Ann Rev Food Sci Technol, 2016, 7: 353-374. DOI:10.1146/annurev-food-041715-033259.
- [36] Tan KK, Tan YC, Chang LY, et al. Full genome SNP-based phylogenetic analysis reveals the origin and global spread of *Brucella melitensis*[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1):93. DOI:10.1186/s12864-015-1294-x.
- [37] Bush WS, Moore JH. Chapter 11:Genome-wide association studies[J]. PLoS Comput Biol, 2012, 8(12):e1002822. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002822.
- [38] Marees AT, de Kluiver H, Stringer S, et al. A tutorial on conducting genome - wide association studies: Quality control and statistical analysis[J]. Int J Methods Psychiatr Res, 2018, 27(2):e1608. DOI:10.1002/mpr.1608.
- [39] Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, et al. 10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation[J]. Am J Human Genet, 2017, 101(1): 5-22. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.06.005.
- [40] Power RA, Parkhill J, de Oliveira T. Microbial genome-wide association studies: lessons from human GWAS[J]. Nat Rev Genet, 2017, 18(1):41-50. DOI:10.1038/nrg.2016.132.
- [41] 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): e00536-15. DOI: 10.1128/mBio.00536-15.
- [42] Wei XL, Chen P Y, Gao RS, et al. Screening and characterization of a non-cyp51A mutation in an *Aspergillus fumigatus* cox10 strain conferring azole resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(1): e02101-16. DOI:10.1128/AAC.02101-16.
- [43] 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.
- [44] Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019[M]. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2019.
- [45] Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses[J]. Clin Infect Dis, 2017, 64(2):134-140. DOI:10.1093/cid/ciw691.
- [46] Chow NA, de Groot T, Badali H, et al. Potential fifth clade of *Candida auris*, Iran, 2018[J]. Emerg Infect Dis, 2019, 25(9):1780-1781. DOI:10.3201/eid2509.190686.
- [47] Sharma C, Kumar N, Pandey R, et al. Whole genome sequencing of emerging multidrug resistant *Candida auris* isolates in India demonstrates low genetic variation[J]. New Microb New Infect, 2016, 13:77-82. DOI:10.1016/j.nmni.2016.07.003.
- [48] Rhodes J, Abdolrasouli A, Farrer RA, et al. Genomic epidemiology of the UK outbreak of the emerging human fungal pathogen *Candida auris*[J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1):1-12. DOI:10.1038/s41426-018-0045-x.
- [49] Salah H, Sundararaju S, Dalil L, et al. Genomic Epidemiology of *Candida auris* in Qatar reveals hospital transmission dynamics and a South Asian origin[J]. J Fungi, 2021, 7(3):240. DOI:10.3390/jof7030240.
- [50] Hamprecht A, Barber AE, Mellinshoff SC, et al. *Candida auris* in Germany and previous exposure to foreign healthcare[J]. Emerg Infect Dis, 2019, 25(9): 1763-1765. DOI:10.3201/eid2509.190262.
- [51] Borman AM, Szekeley A, Johnson EM. Isolates of the emerging pathogen *Candida auris* present in the UK have several geographic origins[J]. Med Mycol, 2017, 55(5): 563-567. DOI:10.1093/mmy/myw147.
- [52] Chow NA, Gade L, Tsay SV, et al. Multiple introductions and subsequent transmission of multidrug-resistant *Candida auris* in the USA: a molecular epidemiological survey[J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(12):1377-1384. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30597-8.
- [53] Farrer RA, Borman AM, Inkster T, et al. Genomic epidemiology of a *Cryptococcus neoformans* case cluster in Glasgow, Scotland, 2018[J]. Microb Genom, 2021, 7(3): 000537. DOI:10.1099/mgen.0.000537.
- [54] Ashton P, Thanh L, Trieu P, et al. Three phylogenetic groups have driven the recent population expansion of *Cryptococcus neoformans*[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2035. DOI:10.1038/s41467-019-10092-5.
- [55] Rhodes J, Desjardins CA, Sykes SM, et al. Tracing genetic exchange and biogeography of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* at the global population level[J]. Genetics, 2017, 207(1): 327-346. DOI: 10.1534/genetics.117.203836.

- [56] Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, et al. (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomyces, Tremellomycetidae) [J]. Taxon, 2002, 51(4):804-806. DOI:10.2307/1555045.
- [57] Billmyre RB, Croll D, Li WJ, et al. Highly recombinant VGII *Cryptococcus gattii* population develops clonal outbreak clusters through both sexual macroevolution and asexual microevolution[J]. mBio, 2014, 5(4): e01494-14. DOI: 10.1128/mBio.01494-14.
- [58] Arastehfar A, Carvalho A, Houbraken J, et al. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: From basics to clinics[J]. Stud Mycol, 2021, 100: 100115. DOI: 10.1016/j.simyco.2021.100115.
- [59] de Abreu Almeida M, Almeida-Silva F, Guimarães A J, et al. The occurrence of histoplasmosis in Brazil: A systematic review[J]. Int J Infect Dis, 2019, 86:147-156. DOI:10.1016/j.ijid.2019.07.009.
- [60] Sepúlveda VE, Márquez R, Turissini DA, et al. Genome Sequences Reveal Cryptic Speciation in the Human Pathogen *Histoplasma capsulatum*[J]. mBio, 2017, 8(6). DOI:10.1128/mBio.01339-17.
- [61] Biswas C, Chen SC, Halliday C, et al. Whole genome sequencing of *Candida glabrata* for detection of markers of antifungal drug resistance[J]. J Vis Exp, 2017, 130: e56714. DOI:10.3791/56714.
- [62] Chew KL, Octavia S, Lin RTP, et al. Delay in effective therapy in anidulafungin-resistant *Candida tropicalis* fungaemia: potential for rapid prediction of antifungal resistance with whole-genome-sequencing[J]. J Global Antimicrob Resist, 2019, 16:105-107. DOI:10.1016/j.jgar.2018.12.010.
- [63] Maphanga TG, Naicker SD, Kwenda S, et al. *In vitro* antifungal resistance of *Candida auris* isolates from bloodstream infections, South Africa[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2021, 65(9):e00517-21. DOI:10.1128/AAC.00517-21.
- [64] Papp C, Bohner F, Kocsis K, et al. Triazole evolution of *Candida parapsilosis* results in cross-resistance to other antifungal drugs, influences stress responses, and alters virulence in an antifungal drug-dependent manner[J]. Msphere, 2020, 5(5): e00821-20. DOI: 10.1128/mSphere.00821-20.
- [65] Ford CB, Funt JM, Abbey D, et al. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*[J]. Elife, 2015, 4:e00662. DOI:10.7554/eLife.00662.
- [66] Etienne KA, Berkow EL, Gade L, et al. Genomic diversity of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the United States [J]. mBio, 2021, 12(4): e01803-21. DOI: 10.1128/mBio.01803-21.
- [67] 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.
- [68] Sharma C, Nelson-Sathi S, Singh A, et al. Genomic perspective of triazole resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates without *cyp51A* mutations[J]. Fungal Genet Biol, 2019, 132: 103265. DOI:10.1016/j.fgb.2019.103265.
- [69] Losada L, Sugui JA, Eckhaus MA, et al. Genetic analysis using an isogenic mating pair of *Aspergillus fumigatus* identifies azole resistance genes and lack of *MAT* Locus's role in virulence[J]. PLoS Pathog, 2015, 11(4):e1004834. DOI:10.1371/journal.ppat.1004834.
- [70] Fan YY, Wang Y, Xu JP. Comparative genome sequence analyses of geographic samples of *Aspergillus fumigatus*—relevance for amphotericin B resistance[J]. Microorganisms, 2020, 8(11): 1673. DOI: 10.3390/microorganisms8111673.
- [71] Puértolas-Balint F, Rossen JWA, dos Santos CO, et al. Revealing the virulence potential of clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates using whole-genome sequencing[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1970. DOI:10.3389/fmicb.2019.01970.
- [72] Chatterjee S, Alampalli SV, Nageshan RK, et al. Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida auris*[J]. BMC Genomics, 2015, 16:686. DOI:10.1186/s12864-015-1863-z.
- [73] Schwartz IS, Kenyon C, Feng PY, et al. 50 Years of *Emmonsia* disease in humans: the dramatic emergence of a cluster of novel fungal pathogens[J]. PLoS Pathog, 2015, 11(11):e1005198. DOI:10.1371/journal.ppat.1005198.
- [74] Jiang Y, Tsui CKM, Ahmed SA, et al. Intraspecific diversity and taxonomy of *Emmonsia crescens*[J]. Mycopathologia, 2020, 185(4):613-627. DOI:10.1007/s11046-020-00475-4.
- [75] Yang Y, Ye Q, Li K, et al. Genomics and comparative genomic analyses provide insight into the taxonomy and pathogenic potential of novel *Emmonsia* pathogens[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 105. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00105.
- [76] Desjardins CA, Giamberardino C, Sykes SM, et al. Population genomics and the evolution of virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*[J]. Genome Res, 2017, 27(7):1207-1219. DOI:10.1101/gr.218727.116.
- [77] Muller LAH, Lucas JE, Georgianna DR, et al. Genome-wide association analysis of clinical vs. nonclinical origin provides insights into *Saccharomyces cerevisiae* pathogenesis[J]. Mol Ecol, 2011, 20(19):4085-4097. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05225.x.
- [78] Fan YY, Wang Y, Korfanty GA, et al. Genome-wide association analysis for triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*[J]. Pathogens, 2021, 10(6):701. DOI:10.3390/pathogens10060701.