

# Azole 抗藥性煙麴黴菌 (*Aspergillus fumigatus*) 之浮現：醫界之潛在隱憂

吳綺容<sup>1,2</sup> 王萱蓁<sup>1</sup> 周佩欣<sup>1</sup> 陳宜君<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所

<sup>2</sup>成大醫院 內科部 感染科

<sup>3</sup>臺大醫院 內科部 感染科

## 前 言

人類麴菌症 (aspergillosis) 是麴菌屬 (*Aspergillus*) 所引起的感染症。麴菌分佈於世界各地，環境中到處存在，其中以煙麴黴菌 (*Aspergillus fumigatus*) 為最常見的致病菌種。麴菌症包括侵襲性麴菌症 (invasive aspergillosis)、麴菌瘤 (aspergilloma) 或出現肺部空洞病灶，及過敏性支氣管肺的麴菌症 (allergic bronchopulmonary aspergillosis) 等。侵襲性麴菌症常出現在免疫不全病人族群，而麴菌瘤常發生在先前已有肺部空洞化病灶的病人。Voriconazole 屬 azole 類藥物，是治療麴菌症的首選藥物。其它麴菌症替代藥物包含另兩種醫用 azole (posaconazole 及 itraconazole)、amphotericinB 及

echinocandin 類藥物[1]。Azole 抗藥性 *A. fumigatus* 菌株於 1997 年首次被發現，為源自 1989 年美國加州的分離菌株[2]。之後，許多國家陸續分離出 azole 抗藥性 *A. fumigatus* 菌株[3-8]，抗藥性菌株盛行率亦有逐年增加的趨勢[9]。*A. fumigatus* 菌株可在臨床 azole 藥物或 azole 類環境殺真菌劑 (azole fungicide) 使用造成的抗生素選擇壓力下產生[10,11]。病人若被 azole 抗藥性 *A. fumigatus* 菌株感染，死亡率高於無抗藥性麴菌症病人[12]。Azole 抗藥性 *A. fumigatus* 之浮現為醫界之潛在隱憂。本文回顧並整理 *A. fumigatus* azole 抗藥性的相關文獻以了解目前全球 *A. fumigatus* azole 抗藥性的現況及其帶來的臨床衝擊及因應對策。

## A. fumigatus 抗黴菌藥物敏感性試驗及判讀

*A. fumigatus* 藥物敏感性試驗可參考「臨床與實驗室標準協會」(Clinical and Laboratory Standards Institute) 或「歐洲臨床微生物及感染症學會」(European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, EUCAST) 的操作指引建議進行[13,14]。兩操作方法均以肉湯微量稀釋法 (broth microdilution method) 進行，兩者所得的最小抑菌濃度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 結果相近[15]。最小抑菌濃度可依「流行病學切割值」(epidemiological cut-off values, ECV 或 ECOFF) 及抗藥性臨床指標 (clinical breakpoint) 兩概念判讀，分述如下。ECV 是指能夠抑制 95% 野生型 (wild type) 菌株的藥物濃度，野生型菌株則是指菌株不帶有後天得到或突變產生的抗藥性基因。若菌株的最小抑菌濃度小於或等於 ECV，表示其為野生型菌株。CLSI 及 EUCAST 於 *A. fumigatus* 的 ECV 之建議相同 (itraconazole 及 voriconazole 均為 1 mg/L，posaconazole 為 0.25 mg/L) [16]。另一方面，在使用一般的治療劑量下，若菌株的最小抑菌濃度高於某濃度時很容易治療失敗，則此濃度則定義為抗藥性臨床指標。EUCAST 定義 *A. fumigatus* 抗藥性臨床指標分別為 itraconazole 或 voriconazole 最小抑菌

濃度大於 2 mg/L 及 posaconazole 最小抑菌濃度大於 0.25 mg/L。CLSI 目前並沒有 *A. fumigatus* 的抗藥性臨床指標建議[16]。

## 全球 A. fumigatus 菌株azole 抗藥性現況

*A. fumigatus* 是最常被報告具azole 抗藥性的 *Aspergillus* 菌屬，此外偶有零星azole 抗藥性 *A. flavus* 及 *A. terreus* 菌株報告[16]。Azole 抗藥性 *A. fumigatus* 臨床菌株之盛行率，除了英國 (the Mycology Reference Centre Manchester) 較高外 (28%)，歐洲其餘各國約為 3.2~10.6%，另伊朗和印度分別為 3.2% 及 1.9% [12,17-21]。另一含美、歐、中國等多國的 *A. fumigatus* azole 抗藥性全球監測研究顯示抗藥性菌株盛行率約為 5.8%。此研究發現的 29 株抗藥性菌株中，有 24 株源自中國[7]。Azole 抗藥性 *A. fumigatus* 環境菌株盛行率則介於 3.3~14%，分別為丹麥 7.2%、荷蘭 6%、印度 7%、伊朗 3.3% 及突尼西亞 14% [3,5,8,22,23]。

## Azole 抗藥性分子機轉

Ergosterol 是真菌細胞膜的重要組成，azole 藥物可藉由抑制 ergosterol 合成所需的 CYP450 酵素 14  $\alpha$ -demethylase，進而減少 ergosterol 合成而改變細胞膜通

透性導致細胞死亡。*cyp51* 基因包含 *cyp51A* 及 *cyp51B* 兩基因，14  $\alpha$ -demethylase 主要的活性部分由 *cyp51A* 基因產物組成[16]。*cyp51A* 基因突變會導致胺基酸及蛋白質結構改變，使得 azole 藥物和 14  $\alpha$ -demethylase 的親和力減弱而使藥物失效。此外，菌株藥物輸出幫浦 (drug efflux pump) 的改變也會導致菌株產生 azole 抗藥性。目前已知的 *A. fumigatus* azole 抗藥性機轉大都屬於 *cyp51A* 基因突變[16]。Azole 抗藥性相關的 *cyp51A* 基因突變可分為以下三大類。第一類，同時出現 *cyp51A* 啟動子縱列重複序列及 *cyp51A* 基因突變，如 TR34/L98H。TR (tandem repeat) 34 代表啟動子較野生株多出 34 個核甘酸的重覆序列 (序列和其緊鄰的上游基因序列相同)，L98H 代表 *cyp51A* 基因突變

導致第 98 個胺基酸由 Leucine 轉變為 Histidine。第二類，*cyp51A* 基因啟動子發生出現縱列重複序列，如 TR53。第三類，*cyp51A* 基因突變而產生胺基酸改變，如 G54 和 M220。不同抗藥性分子機轉媒介的 azole 抗藥譜 (antibiogram) 亦不同。例如帶有 G54 突變基因型菌株之 itraconazole 及 posaconazole 最小抑菌濃度均會升高，voriconazole 則較不受影響。帶有 M220、TR34/L98H 或 TR46/Y121F/T289A 基因型菌株之上述三種 azole 最小抑菌濃度均會升高[16]。文獻報告各類 azole 抗藥性 *A. fumigatus* 菌株 *cyp51A* 突變基因型及其對應之抗藥譜詳列於表一[16]。

## Azole 選擇壓力與抗藥性產生

抗黴菌藥物使用選擇壓力下篩

表一 Azole 抗藥性 *Aspergillus fumigatus* 菌株 *cyp51A* 基因突變基因型別及其 azole 藥物最小抑菌濃度分布 [16]

Cyp51A 胺基酸改變	參考菌株數	最小抑菌濃度 (mg/L)		
		Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole
G54E	6	> 8	0.25~0.5	0.25~1
G54R	6	> 8	0.12~0.5	1
G138C	10	> 8	4~> 8	1~> 8
M220I	6	> 8	1	0.5
M220K	4	> 8	1~2	1~> 8
M220T	6	> 8	0.5~1	0.25~0.5
M220V	3	> 8	1~2	0.5~1
TR34/L98H	110	> 8	1~> 8	0.25~8
TR46/Y121/T289A	29	0.5~> 8	> 8	0.25~4
TR53	1	> 8	> 8	0.25
F219I	6	> 8	1~8	0.5~> 16

選出 azole 抗藥性 *A. fumigatus* 菌株的風險和 *A. fumigatus* 所表現的生長型態有關。於急性侵襲性麴菌感染時，*A. fumigatus* 以菌絲分裂延長為主要的生長型態。雖菌絲內少數細胞核可在分裂過程發生抗藥性相關之基因突變，但大部分的細胞核仍是維持沒有突變的野生型，因此整體菌株仍是呈現具 azole 藥物感受性之表現型。但若病人病症為麴菌瘤或具空洞化病灶，病灶表面的 *A. fumigatus* 會出現子實體的生長型態並會進行無性生殖生成孢子。若子實體是由具抗藥性突變基因細胞核分裂而成，則整株子實體及之後產生的孢子均會帶有相同的抗藥性突變基因，因而菌株呈現 azole 抗藥性表現型。這也說明了歸因於臨床 azole 治療選擇壓力下篩選出來的抗藥性菌株通常分離自具麴菌瘤或具空洞化病灶之病人，而較少分離自急性侵襲性麴菌症病人[24]。此類因臨床治療而篩選出的 azole 抗藥性分子機轉以為 *cyp51A* 基因突變 G54 和 M220 基因型為代表[25]。

另一方面，許多分離出 azole 抗藥性 *A. fumigatus* 菌株的病人先前從未接受過 azole 治療，顯示病人的感染源來自環境中的抗藥性菌株。環境 azole 類殺真菌劑(以下簡稱環境殺真菌劑)可防治由真菌引起的農作物病害或是做為木製品防腐劑以延緩木材腐朽，因此在環境中普遍被使用。以荷蘭為例，2004 年所消耗的環境殺真菌劑約 130 公噸，是

醫用 azole 藥物(400 公斤)的 320 倍[24]。其中有五種環境殺真菌劑(包含 tebuconazole)和醫用 azole 結構極為相似，並且在臨床抗藥性菌株被發現(1997 年)的前幾年被核准並大量使用[11]。環境殺真菌劑的選擇壓力會篩選出同時對環境及醫用 azole 抗藥性 *A. fumigatus* 環境菌株[11]。此類因環境殺真菌劑而篩選出的抗藥性分子機轉以 *cyp51A* 基因突變 TR34/L98H 和 TR46/Y121F/T289A 基因型為代表[19,23,24]。

各地 azole 抗藥性 *A. fumigatus* 臨床及環境菌株的抗藥性分子機轉分布略有差異。在歐洲國家，約三成至七成的臨床抗藥性菌株屬於 TR34/98H 基因型[17-21]，三成至五成屬 G54 或 M220 基因型[17,18,20]，荷蘭約有兩成臨床抗藥性菌株屬 TR46/Y121F/T289A 基因型[19]。約八成的印度、丹麥、荷蘭及坦尚尼亞的抗藥性環境菌株屬 TR43/98H 基因型[2,3,8,22]，一至二成多的荷蘭及坦尚尼亞的環境抗藥性菌株屬 TR46/Y121F/T289A 基因型[3,19]。部分臨床或環境抗藥性菌株的 *cyp51A* 基因並沒有產生突變，表示此類菌株存在非 *cyp51A* 突變相關之抗藥性機轉。

## 環境殺真菌劑與麴菌 azole 抗藥性之關聯

荷蘭研究發現，分離自不同醫院且沒有地緣關係病人的抗藥性 *A.*

*fumigatus* 菌株中，高達 94% 菌株均屬於 TR34/L98H 基因型。理論上，源自不同病人因臨床治療而篩選出的抗藥性菌株所帶有的抗藥性基因型別應該會很多元[10]。再者，64% 分離出抗藥性菌株的病人先前並未接受過 azole 藥物治療[24]。流行病學研究亦顯示臨床和環境 TR34/L98H *A. fumigatus* 抗藥性菌株間具有極高的親緣相關性[23]。學者因而推論環境中廣泛存在 TR34/L98H 基因型抗藥性菌株，各地病人因吸入或接觸孢子或菌株而得病[24]。環境 TR34/L98H 抗藥性菌株的產生則和環境殺真菌劑的使用有高度關聯性。以黴菌生物學觀點而言，縱列重複序列類型的突變常發生在絲狀黴菌生活史中的有性生殖階段，然而 *A. fumigatus* 有性生殖階段極少出現於人類麴菌症，此顯示 TR34 突變的產生可能發生於環境菌株進行有性生殖的過程[24,26]。此外，在某藥物選擇壓力下篩選出的抗藥性菌株常會對此藥物產生抗藥性。不同於臨床治療篩選出的 G54 基因型菌株對環境殺真菌劑仍具感受性，TR34/L98H 菌株除了表現醫用 azole 抗藥性，也同時表現環境殺真菌劑抗藥性[11]。抗藥性誘導實驗亦顯示 TR34/L98H 菌株在含 tebuconazole 的培養基下可再次產生 TR34 縱列重複序列突變[27]。田野調查發現環境抗藥性菌株常分離自有農業用藥使用的農作地，而少分離自未用藥的自然界土壤[24]。綜合以上觀察研究顯

示，環境殺真菌劑的選擇壓力會篩選出同時對環境及醫用 azole 具抗藥性的 *A. fumigatus* 環境菌株[24]。環境的抗藥性菌株可以黴菌孢子或子囊孢子型態經風吹大規模散播各地，再感染高危險群病人，為易感染族群潛在之威脅。因此，即使病人未曾接受過 azole 藥物治療，亦有可能得到抗藥性菌株的感染，亦即無法以藥物史預測病人是否感染抗藥性菌株。此環境抗藥性菌株存在之難題，也非臨床抗生素謹慎使用可以解決。

迄今，許多國家已分離出臨床及環境 TR34/L98H *A. fumigatus* 菌株。親緣關係圖顯示各國的 TR34/L98H 菌株並非源自同一祖先，而是各地各自演化而來[4,8]。此也顯示 *cyp51A* 基因含有突變熱點，環境菌株在環境殺真菌劑的選擇壓力下會篩選出抗藥性突變菌株。若環境殺真菌劑選擇壓力持續存在，除了會讓已出現抗藥性基因繼續保持下來，其它型別的抗藥性基因突變也會陸續浮現[2]。目前科學家正努力找出篩選出 azole 抗藥性菌株的關鍵環境殺真菌劑，希望藉由減低這類藥物的使用而減少環境抗藥性菌株的產生[11]。然而，已經產生且廣泛存在環境中的抗藥性菌株，如 TR34/L98H 和 TR46/Y121F/T289A 菌株，並不容易消失[19]。有鑑於環境殺真菌劑在全球各地廣泛被使用，相關的抗藥性機轉也可能發生在其它 *Aspergillus* 菌種或其它絲狀黴菌，篩選出的抗藥性菌株亦會隨風飄散，因

此 azole 抗藥性環境菌株之浮現，並非侷限於單一區域或單一菌種。此也顯示各區域系統性定期進行重要致病絲狀黴菌之臨床及環境菌株抗藥性盛行率監測的重要[11,16,19,24]。

## 台灣 *A. fumigatus* azole 抗藥性現況

2003 年一多中心抗藥性監測研究 (含 40 株 *A. fumigatus*) 並未發現具 voriconazole 抗藥性之 *A. fumigatus* 菌株，但那時已發現 itraconazole 抗藥性菌株 (最小抑菌濃度 > 2 mg/L) [28]。由於大部分醫院微生物檢驗部門沒有例行性進行絲狀黴菌藥物敏感性試驗，相關研究亦缺乏，所以台灣 azole 抗藥性 *A. fumigatus* 臨床及環境菌株之盛行率並不清楚。Azole 類環境殺真菌劑 (如 penconazole 和 tebuconazole) 已在台灣使用一段時間[29]。再者，國衛院除了發現具高度親源相關的 azole 感受性降低 *Candida tropicalis* 臨床菌株和環境菌株 (皆對 fluconazole 及環境殺真菌劑感受性降低) 外[29]，也發現 TR34/L98H azole 抗藥性 *A. fumigatus* 本地菌株。因此推測在台灣的環境中應已存在 azole 抗藥性 *A. fumigatus* 菌株，是一潛在的隱憂。因此，有需要進行全國性 azole 抗藥性臨床及環境菌株盛行率研究。此外，目前台灣大部分醫院微生物檢驗部門並沒有常規將臨床分離絲狀菌菌株鑑定至菌「種」。

以麴菌而言，所發檢驗報告通常為 *Aspergillus spp.*。若抗藥性監測研究顯結果顯示高 azole 抗藥性盛行率，臨床於分離出 *Aspergillus* 菌株時，應進一步鑑定是否為 *A. fumigatus*。若致病菌株為 *A. fumigatus*，則需進一步進行藥物敏感性試驗，了解菌株是否帶有 azole 抗藥性，以確保臨床治療選用有效的抗黴菌藥物。

## Azole 抗藥性之臨床衝擊、因應與治療

荷蘭一多中心研究顯示，被 azole 抗藥性 *A. fumigatus* 菌株感染的病人之死亡率高達 88%，遠高於被無抗藥性菌株感染病人之死亡率 (48%) [12]。再者，TR46/Y121F/T289A 型菌株之 voriconazole 最小抑菌濃度均高於 16 mg/L，5 位受此類菌株感染並接受 voriconazole 治療的病人最後都死亡[19]。因為 voriconazole 是麴菌症首選用藥，抗藥性麴菌症死亡率高的原因，部分可歸因於病人接受無效的經驗性療法而導致病情惡化 [12]。延遲治療是侵襲菌黴菌高死亡率的主要原因，因此學者提出，若 *A. fumigatus* azole 抗藥性盛行率高於 10% 時，麴菌症經驗療法需考慮使用合併療法，如 azole 合併 amphotericin B 使用，並積極送檢進行黴菌培養。若可分離出菌株，後續再依藥物敏感性試驗結果調整藥物[2]。有鑑於傳統黴菌培養、鑑定及藥物敏感性

測試完整流程常需 2~3 個星期，荷蘭團隊發展含 azole 的選擇性培養基 (四盤分別為含 voriconazole 1 mg/L、itraconazole 4 mg/L 及 posaconazole 0.5 mg/L 之培養基及不加藥物對照組) 以快速偵測抗藥效性菌株，臨床檢體或是剛長出的 *A. fumigatus* 聚落可直接塗在選擇性培養基培養。因能在含選擇性培養基生長的多是抗藥性菌株，此方法可較傳統流程提早約 1~2 星期了解病人是否感染抗藥性菌株[30]。此外，因侵襲性黴菌感染約有 5 成病例培養結果為陰性，可針對常見的抗藥性基因設計聚合酶連鎖反應引子，直接進行臨床檢體或菌株抗藥性基因的偵測[31,32]。不過需對當地菌株的抗藥分子機轉有相當程度的了解才能應用此方法。

目前針對 azole 抗藥性麴菌症並沒有治療指引。研究顯示，和脂肪結合的 amphotericin B 或是合併療法 (voriconazole 或 posaconazole 併用 echinocandin 藥物) 可能有效[16]。有鑑於不同抗藥機轉菌株對三種醫用 azole 的抗藥譜仍有差異，研究亦評估單一 azole 藥物治療 azole 抗藥麴菌症的可能性。綜合最小抑菌濃度及藥物動力學等因子考量，若菌株 voriconazole 最小抑菌濃度等於 2 mg/L，仍可使用 voriconazole 單一藥物治療。然為能達到有效的藥物血清濃度，建議使用注射劑型並密集追蹤血清濃度、評估臨床及影像學是否改善等參數，做為藥物調整的參考。

但若菌株最小抑菌濃度高於或等於 2 mg/L，不建議單一藥物治療[16]。若菌株 posaconazole 最小抑菌濃度高於或等於 0.5 mg/L，因為目前口服劑型的 posaconazole 無法達到有效的治療濃度，所以不建議 posaconazole 單一藥物治療。未來若注射劑型 posaconazole 已可臨床使用，也許可以達到治療濃度而單一藥物使用，不過仍需試驗臨床研究證實[16]。

## 結語

除了較熟知的歸因於臨床 azole 治療選擇壓力下產生抗藥性菌株，環境殺真菌劑使用的選擇壓力亦會篩選出同時對環境及醫用 azole 具抗藥性的 *A. fumigatus* 環境菌株。目前全球臨床及環境 azole 抗藥性 *A. fumigatus* 菌株盛行率約為 3~14%，因此臨床處置 azole 治療失敗麴菌症，需考慮菌株 azole 抗藥性的可能。此外，各區域也需系統性定期進行臨床及環境 azole 抗藥性 *A. fumigatus* 菌株之盛行率調查，以為當地治療麴菌症之參考。

## 參考文獻

1. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al: Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2008;46:327-60.
2. Denning DW, Bowyer P: Voriconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: should we be concerned? Clin Infect Dis 2013;57:521-3.

3. Chowdhary A, Sharma C, van den Boom M, et al: Multi-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment in Tanzania. *J Antimicrob Chemother* 2014;9:2979-83.
4. Seyedmousavi S, Hashemi SJ, Zibafar E, et al: Azole-resistant *Aspergillus fumigatus*, Iran. *Emerg Infect Dis* 2013;19:832-4.
5. Badali H, Vaezi A, Haghani I, et al: Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in the *cyp51A* gene in Iran. *Mycoses* 2013;56:659-63.
6. Chowdhary A, Kathuria S, Randhawa HS, et al: Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:362-6.
7. Lockhart SR, Frade JP, Etienne KA, et al: Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance study is primarily due to the TR/L98H mutation in the *cyp51A* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4465-8.
8. Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, 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. *PLoS One* 2012;7:e52871.
9. Verweij PE, Howard SJ, Melchers WJ, et al: Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resist Updat* 2009;12:141-7.
10. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, et al: Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis* 2009;15:1068-76.
11. Snelders E, Camps SM, Karawajczyk A, et al: Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 2012;7:e31801.
12. van der Linden JW, Snelders E, Kampinga GA, et al: Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1846-54.
13. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
14. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:982-4.
15. Pfaller M, Boyken L, Hollis R, et al: Comparison of the broth microdilution methods of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and the Clinical and Laboratory Standards Institute for testing itraconazole, posaconazole, and voriconazole against *Aspergillus* isolates. *J Clin Microbiol* 2011;49:1110-2.
16. Seyedmousavi S, Mouton JW, Melchers WJ, et al: The role of azoles in the management of azole-resistant aspergillosis: From the bench to the bedside. *Drug Resist Updat* 2014;17:37-50
17. Rodriguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, et al: Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2468-72.
18. Mortensen KL, Jensen RH, Johansen HK, et al: *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. *J Clin Microbiol* 2011;49:2243-51.
19. van der Linden JW, Camps SM, Kampinga GA, et al: Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clin Infect Dis* 2013;57:513-20.
20. Morio F, Aubin GG, Danner-Boucher I, et al: High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1870-3.
21. Bader O, Weig M, Reichard U, et al: *cyp51A*-Based mechanisms of *Aspergillus fumigatus* azole drug resistance present in clinical samples from Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:3513-7.
22. Mortensen KL, Mellado E, Lass-Flörl C, et al: Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4545-9.

23. Snelders E, Huis In't Veld RA, Rijs AJ, et al: Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:4053-7.
24. Verweij PE, Snelders E, Kema GH, et al: Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis* 2009;9:789-95.
25. Chen J, Li H, Li R, et al: Mutations in the *cyp51A* gene and susceptibility to itraconazole in *Aspergillus fumigatus* serially isolated from a patient with lung aspergilloma. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:31-7.
26. O'Gorman CM, Fuller H, Dyer PS: Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2009;457:471-4.
27. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, et al: A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1897-904.
28. Hsueh PR, Lau YJ, Chuang YC, et al: Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species from Taiwan: surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan program data from 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:512-7.
29. Yang YL, Lin CC, Chang TP, et al: Comparison of human and soil *Candida tropicalis* isolates with reduced susceptibility to fluconazole. *PLoS One* 2012;7:e34609.
30. Van der Linden JWM, Arendrup MC, Van der Lee HAL, et al: Azole containing agar plates as a screening tool for azole resistance of *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses* 2009;52:19.
31. Buitrago MJ, Aguado JM, Ballen A, et al: Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E271-7.
32. van der Linden JW, Snelders E, Arends JP, et al: Rapid diagnosis of azole-resistant aspergillosis by direct PCR using tissue specimens. *J Clin Microbiol* 2010;48:1478-80.