REVIEW ARTICLE

Azole Resistance in Aspergillus fumigatus Isolates

Afsaneh Vaezi[1],
Iman Haghani[2],
Mehrnaz Mohammad Davoudi[3],
Bita Mousavi[4],
Saham Ansari[4],
Mohammad Ali Noshak[5],
Sadegh Khodavaisy[6],
Hamid Badali[7]

[1] MSc Student in Medical Mycology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] MSc in Medical Mycology, Invasive Fungi Research Center, Faculty of Medicine,Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Student in Medicine, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] PhD Student in Medical Mycology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Lecturer, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
[6] PhD Student in Medical Mycology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran and Lecturer, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
[7] Assistant Professor, Invasive Fungi Research Center, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received January 8, 2013 ; Accepted June 29, 2013)

Abstract

Invasive Aspergillosis (IA) is an important cause of mortality and morbidity in the immunocompromised host such as, neutropenic individuals, chronic granulomatous disorder, leukemia, those undergoing solid organ transplantation, patients using broad spectrum antibiotics and steroids, patients with severe underlying diseases and patients with chronic pulmonary obstructive disease are among the main risk groups. Successful management in the treatment of IA depends on early diagnosis and treatment, the adequate choice of therapy, and antifungal resistance. The diagnosis of IA remains difficult and significant proportions of cases of IA remain undetected, thus in case of IA treatment should be considered as early as possible and carried out until the improvements. The treatment is usually based on surgery, antifungal therapy and reduction of immunosuppression. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* was first observed in Netherlands in 1999. Full mechanism of evolution of azole resistance is not completely known, however, increasing evidence indicates a role for azole fungicide used in agriculture. Due to the presence of *A. fumigatus* as an agent of IA in our environment and risk for patients, understanding the evolution of the increasing azole resistance in *A. fumigatus* is crucially recommended. Therefore, induction of azole resistance or its spread can be possibly prevented to allow future treatment of IA due to *A. fumigatus*.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, azole resistant, cyp 51A gene, 14 α- demethylase

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(103): 120-137 (Persian).

مجـلـــه دانـشـــگاه عـلـــوم پـزشـکـــی مـــازنـــدران
دوره بیست و سوم شماره ۱۰۳ مرداد سال ۱۳۹۲ (۱۲۰-۱۳۷)

مروری بر پیدایش مقاومت به داروهای گروه آزولی در آسپرژیلوس فومیگاتوس

افسانه واعظی[۱]
ایمان حقانی[۲]
مهرناز محمد داودی[۳]
بیتا موسوی[۴]
سهام انصاری[۴]
محمد علی نوشک[۵]
صادق خداویسی[۶]
حمید بدلی[۷]

چکیده

آسپرژیلوزیس مهاجم عفونت شدید با مرگ و میر بسیار بالا در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی، نوتروپنی شدید، گرانولوماتوز مزمن، بدخیمی‌های خونی، دریافت‌کنندگان پیوند مغز استخوان، سلول‌های بنیادی و افراد در حال استفاده از استروئیدها و آنتی‌بیوتیک‌های طولانی مدت و هم‌چنین ظهور گروه‌های جدید در معرض خطراز قبیل افراد مبتلا به بیماری انسدادی مزمن ریوی است. مدیریت درمانی موفقیت آمیز آسپرژیلوزیس مهاجم، وابسته به شروع به موقع درمان، انتخاب داروی مؤثر ضد قارچی و عدم مقاومت قارچ به آن می‌باشد. تشخیص آسپرژیلوزیس تهاجمی بسیار مشکل بوده بنابراین به عنوان یکی از مشکلات در قارچ‌شناسی مطرح می‌باشد لذا در این بیماران درمان بایستی سریع و در پی مظنون شدن به بیماری شروع شده و تا زمان بهبودی کامل ادامه یابد. درمان این بیماری در صورت امکان بیش‌تر بر اساس جراحی، داروهای ضد قارچی و کاهش سرکوب ایمنی می‌باشد. مقاومت آزولی در ایزوله‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* از سال ۱۹۹۹ در هلند مشاهده گردید. نحوه شکل‌گیری و تکامل مکانیسم مقاومت آزولی مشخص نشده است ولی آن‌چه مشخص است گسترش مقاومت آزولی درمحیط و این‌که بیماران مبتلا به آسپرژیلوزیس مهاجم با ایزوله‌های مقاوم به *آ.فومیگاتوس* درمان آزولی موفقی نخواهند داشت به‌علت وجود *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در محیط، ریسک بالایی برای ابتلا به آسپرژیلوزیس در بیماران وجود دارد و ازآزول‌ها برای پروفیلاکسی و درمان آن‌ها استفاده می‌شود. بنابراین بررسی علت افزایش مقاومت آزولی در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* مسأله بسیار مهمی می‌باشد زیرا گسترش مقاومت می‌تواند در کنترل بیماری‌های ناشی از این قارچ اختلال ایجاد کند.

واژه های کلیدی: *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، مقاومت آزولی، ژن *Cyp51A*، *آنزیم الفا دی متیلاز*

مقدمه

آسپرژیلوس‌ها از دسته قارچ‌های ساپروفیتی‌اند که به فراوانی در محیط اطراف ما حضور داشته و بیماران مستعد از طریق هوا، آب، غذا و گرد و غبار در معرض تماس با کونیدی‌های این قارچ قرار می‌گیرند(۲،۱).

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۱۳۶- ۹۱ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مولف مسئول: حمید بدلی- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail:badalii@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. کارشناس ارشد قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های مهاجم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشجوی دکترای قارچ شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. مربی، گروه میکروبیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۶. دانشجوی دکترای قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران و مربی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۷. استادیار، مرکز تحقیقات قارچ های مهاجم، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۱/۱۰/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۲/۱۴ تاریخ تصویب : ۱۳۹۲/۴/۸

با وجود این‌که حدود ۴۰ گونه از آسپرژیلوس به عنوان پاتوژن انسانی شناسایی شده‌اند، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* عامل تقریباً ۹۰ درصد عفونت‌های سیستمیک ناشی از این قارچ می‌باشد(۴،۳). دلیل قدرت بیماری‌زایی بالاتر این گونه را به بعضی از خصوصیات منحصر به فرد، تحمل حرارتی بالا، سایز کوچک کونیدی، لایه هیدروفوبیک کونیدی، تطابق‌پذیری تغذیه‌ای و رشد سریع این قارچ نسبت می‌دهند(۷-۵). بروز آسپرژیلوزیس مهاجم (Invasive Aspergillosis(IA با فعالیت‌های ساختمان سازی یا تعمیراتی در مکان های مجاور با محل نگهداری بیماران پرمخاطره و هم‌چنین افزایش روز افزون بیماران با نقص در سیستم ایمنی ارتباط دارد. قبل از دهه ۱۹۰۰ عفونت‌های ناشی از گونه های آسپرژیلوس نادر بوده واز لحاظ کلینیکی اهمیت بسیار کمی داشتند(۸). اما در سال‌های اخیر، با پیشرفت علم پزشکی در زمینه بدخیمی، پیوند اعضاء، مصرف آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، مصرف داروهای تضیف کننده سیستم ایمنی و همچنین افزایش بسیاری از بیماری‌های سیستم ایمنی (به خصوص در رابطه با نقص در عملکرد نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها) شیوع این بیماری افزایش چشمگیری یافته است(۹)، طوری که به اعتقاد بسیاری از محققین IA را می‌توان عمدتاً یکی از عفونت‌های عصر پیشرفت‌های علم پزشکی دانست. درمان این بیماری بسیار مشکل بوده و علی‌رغم استفاده از داروهای ضدقارچی مرگ و میر بیماری بسیار بالا می‌باشد(۱۰). مدیریت درمان موفقیت‌آمیز این بیماری وابسته به شروع به موقع درمان، انتخاب داروی مؤثر ضد قارچی و عدم مقاومت قارچ به آن می‌باشد. داروهای آزولی از جمله داروهای ضد قارچی می‌باشند که در درمان اکثر بیماری‌های تهاجمی قارچی از جمله IA و هم‌چنین به عنوان پروفیلاکسی در بیماران دارای زمینه مستعد جهت ابتلاء به این عفونت‌ها استفاده می‌شوند(۱۱). اولین بار در سال ۱۹۹۹، شکست درمانی در بیماران مبتلا به IA ناشی از ایزوله‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* مقاوم به داروهای گروه آزول گزارش شد(۱۲). نحوه دقیق شکل گیری و تکامل مکانیسم مقاومت آزولی مشخص نشده است، ولی شواهد زیادی نقش قارچ‌کش‌های آزولی مورد استفاده درکشاورزی را در ارتباط با این مکانیسم نشان می‌دهند. بررسی علل افزایش مقاومت آزولی در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* موضوع بسیار مهمی می‌باشد، زیرا گسترش مقاومت می‌تواند در کنترل آسپرژیلوزیس تهاجمی اختلال ایجاد نماید. لذا در مقاله حاضر سعی خواهد شد با مروری جامع بر جنبه‌های مختلف بالینی، اپیدمیولوژی و تشخیص آسپرژیلوزیس تهاجمی و هم‌چنین وجود و مکانیسم مقاومت آزولی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* مورد بحث قرار خواهد گرفت. در مطالعه مروری حاضر با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی نظیر Pubmed Medline، Scopous، Google Scholar، Elsevier databases ، Irandoc ، Iranmedex ، Magiran ، SID و MEDLIB با کلمات کلیدی قارچ‌های بیماری‌زا، *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، مقاومت آزولی، ژن Cyp51A آنزیم α ۱۴- دی متیلاز مقالات مرتبط منتشر شده طی سال‌های ۱۹۹۲ تا ۲۰۱۰ استخراج و مطالعه مروری بر آن انجام گرفت.

آسپرژیلوزیس مهاجم؛ اپیدمیولوژی و تشخیص:

آسپرژیلوزیس مهاجم عفونت شدید با مرگ و میر بسیار بالا در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی، نوتروپنی شدید، گرانولوماتوز مزمن، بدخیمی‌های خونی، دریافت‌کنندگان پیوند مغز استخوان، سلول‌های بنیادی و افراد در حال استفاده از استروئیدها و آنتی‌بیوتیک‌های طولانی مدت و هم‌چنین ظهور گروه‌های جدید در معرض خطراز قبیل افراد مبتلا به بیماری انسدادی مزمن ریوی Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) است(۱۰). در این بیماران، اختلالات ایجاد شده در وظایف فاگوسیتوز همراه با بیماری‌های شدید زمینه‌ای منجر به آلودگی و پیشرفت IA می‌شود. با

کاهش مقاومت سیستم دفاعی میزبان، پس از مواجه با دوز زیادی از اسپورهای آسپرژیلوس شرایط مناسب جهت توسعه عفونت ایجاد می‌شود(۱۳). بیماری در ریه به وسیله ژرمیناسیون هایف از کونیدی‌های استنشاقی، تکثیر و تهاجم از طریق برونش‌ها به داخل رگ‌های ریوی و پارانشیم صورت می‌گیرد. این فرم از آلودگی دارای خصوصیت تهاجم به رگ‌های خونی بوده و امکان انتشار به دیگر ارگان های بدن، خصوصاً سیستم عصبی مرکزی نیز وجود دارد(۱۴). در دهه‌های اخیر، شیوع IA در جمعیت بیماران با نقص ایمنی و گروه‌های با خطر ابتلا بالا رو به افزایش بوده و مشاهدات کلینیکی و آزمایشگاهی بیان کننده افزایش گونه‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به عنوان یک پاتوژن اصلی در بیماران دارای فاکتورهای خطر آلودگی می‌باشد(۷). مطالعه‌ای با بررسی موارد اتوپسی سال‌های ۱۹۷۸ تا ۱۹۹۲، افزایش نسبی در میزان شیوع IA با افزایش ۱۷ درصد تا ۶۰ درصد نسبت به دوره‌های قبل نشان می‌دهد(۱۵). در جدول شماره ۱ میزان شیوع بیماری IA گروه‌های مختلف در معرض ابتلاء به این بیماری نشان داده شده است. نکته قابل توجه در ارتباط با این بیماری میزان مرگ و میر بالا (حدود ۸۵-۳۵ درصد) ناشی از آن است(۱۶). از دلایل بالا بودن مرگ و میر در این بیماری می توان به عدم توجه کافی به آلودگی‌های تهاجمی قارچی در مراحل اولیه بیماری، غیر اختصاصی بودن اکثر علایم بالینی، عدم تشخیص به موقع و استفاده از روش‌های تشخیصی با حساسیت پایین و زمان بر مثل روش‌های کشتی، نبود معیارهای تشخیصی یکسان و هم‌چنین به تاخیر افتادن درمان با داروهای مؤثر ضد قارچی اشاره کرد(۱۷).

همان‌طور که اشاره شد، تأخیر در تشخیص یکی از دلایل افزایش مرگ و میر ناشی از این بیماری است و تشخیص سریع و مناسب در جهت مدیریت و کنترل بیماری بسیار ضروری می‌باشد. اما این در حالی است که علی‌رغم پیشرفت‌های حاصله در روش‌های تشخیصی و درمانی بیماری دارای پیش‌آگهی ضعیفی می‌باشد. تشخیص در مراحل اولیه بیماری جهت درمان موفق بسیار ضروری است ولی به علت سرکش بودن بیماری و نبود علایم و نشانه‌های مشخص در مراحل ابتدایی و پایین بودن ایندکس‌های تشخیصی اغلب به تأخیر می‌افتد و متاسفانه تشخیص قطعی این بیماری قبل از تکثیر فراوان قارچ و یا قبل از مرگ بیمار به ندرت صورت می‌پذیرد(۱۸).

جدول شماره ۱: شیوع و میزان مرگ و میر بیماری IA گروه های در بیماران مستعد به ابتلا (۱۴).

گروه های میزبان	مرگ و میر (درصد)	شیوع بیماری IA (درصد)
لوسمی حاد	۴۰-۳۰	۲۴-۵
دریافت کنندگان پیوند مغزاستخوان آلوژنیک	۶۰	۱۰
دریافت کنندگان پیوند بافت سخت	۶۰-۵۰	۱۴-۱۱
بیماران با سیستم ایمنی ضعیف*	۸۵-۷۰	۷-۴

*بیماران مبتلا به ایدز، بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه، سوختگی ها و ...

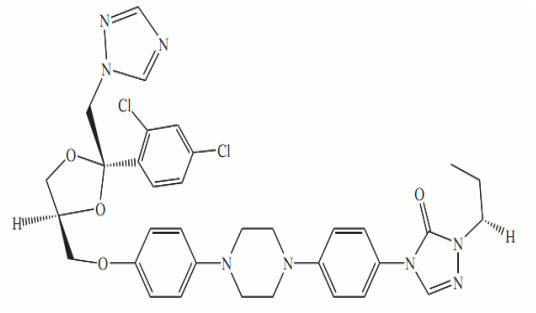
با توجه به این که علایم بالینی و تصاویر رادیوگرافی و مشاهدات Computerised Tomography Scan CT scan مرتبط با IA اختصاصی نبوده و به همین خاطر پزشکان به تکنیک‌های تشخیصی معتبر و با ارزش برای مراقبت صحیح و درمان بیماران آلوده نیازمند هستند. روش‌های مختلف کشتی و راه‌های سریع غیر کشتی برای تشخیص بیماری IA به کار برده می‌شوند. از جمله ابزارهای تشخیصی مهم در آسپرژیلوزیس تهاجمی استفاده از مارکرهای دیواره سلولی قارچ مثل گالاکتومانان، بتا ۱و۳ گلوکان می‌باشد. آنتی ژن گالاکتومانان یک ترکیب دیواره سلولی است که در طی ابتلا به عفونت توسط آسپرژیلوس آزاد شده و تعیین آن در سرم و سایر نمونه‌های بیولوژیکی از قبیل ادرار و مایع لاواژ در تشخیص زود هنگام IA مفید می‌باشد. کشت فقط در ۳۰ تا ۵۰ درصد موارد مثبت است و این در زمانی است که میزان بار قارچی بسیار زیاد باشد. آزمایش بتا ۱و۳ گلوکان به منظور شناسایی و کنترل عفونت دارای محدودیت‌هایی می‌باشد زیرا نتیجه آزمایش دردیگر

عفونت‌های قارچی مثل کاندیدمی و عفونت ناشی از گونه‌های فوزاریوم نیز مثبت می‌شود(۱۹). یک ابزار مفید دیگر برای تشخیص آسپرژیلوزیس تهاجمی که در حال گسترش می‌باشد ردیابی اسید نوکلئیک مربوط به *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در نمونه‌های بالینی می باشد که استاندارد سازی وبهینه سازی آن در حال بررسی است(۲۰،۲۱) طبق توافق European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG)[۲] در سال ۲۰۰۲ که اخیراً در سال ۲۰۰۸ نیز مورد تجدید نظر قرار گرفته است، بیماری IA را از نظرسطح شواهد به سه دسته تقسیم می‌کنند. این تعاریف که به منظور تشخیص آسپرژیلوزیس تهاجمی می‌باشد براساس فاکتورهای میزبان، معیارهای کلینیکی و شواهد قارچ شناسی عفونت مورد بررسی قرار می‌گیرد(۲۲). براین اساس اگر شخصی فاکتورهای کلینیکی و مربوط به میزبان را نشان دهد ممکن است مبتلا به آسپرژیلوزیس تهاجمی باشد (possible). اگر دو فاکتور یاد شده به همراه یکی از موارد شواهد قارچ شناسی را نشان دهد احتمال عفونت مهاجم در وی وجود دارد (probable). اگر با تست هیستوپاتولوژی و آزمایش مستقیم و کشت احتمال فوق تائید شود فرد به طور قطع مبتلا به آسپرژیلوزیس تهاجمی می‌باشد (proven). هر چند که جهت تشخیص بیماری قارچی تهاجمی از معیارهای تشخیصی دستورالعمل EORTC/MSG استفاده می‌شود ولی این دستورالعمل جهت تشخیص IA در بیماران دارای وضعیت وخیم و با سیستم ایمنی ضعیف بیماران بستری در ICU (Intensive Care Unit) مناسب نمی‌باشد و این تعریف بیش‌تر استانداردی برای تحقیقات اپیدمیولوژی و کلینیکی جهت بیماران دارای فاکتورهای خطر کلاسیک مثل نوتروپنی، سرطان‌های خونی، بیماران پیوندی مثل HSCT (Hematopoietic Stem Cell Transplantation) تعریف شده است و در بررسی‌های بالینی و درمانی در سایر گروه‌های در معرض ابتلاء به IA خیلی مفید و مورد استفاده قرار نمی‌گیرد.

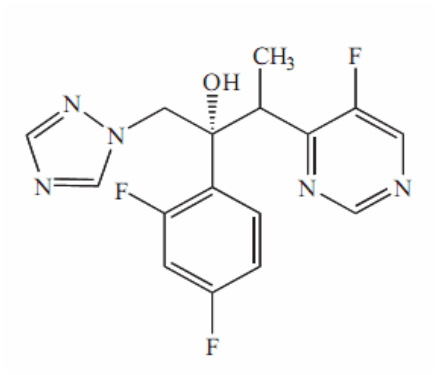
درمان آسپرژیلوزیس مهاجم:

در طی دهه‌های اخیر، مطالعات زیادی در ارتباط با درمان IA و استفاده از داروهای جدید و جایگزین صورت گرفته است. درکل درمان این بیماری بسیار مشکل بوده و علی‌رغم استفاده از داروهای ضدقارچی مرگ و میر بیماری بسیار بالا می‌باشد(۲۳). مدیریت درمانی موفقیت‌آمیز IA، وابسته به شروع به موقع درمان، انتخاب داروی مؤثر ضد قارچی و عدم مقاومت قارچ به آن می‌باشد. در این بیماران درمان باید سریع و در پی مظنون شدن به بیماری شروع شده و تا زمان بهبودی کامل ادامه یابد. درمان این بیماری بیش‌تر بر اساس جراحی (در صورت امکان)، داروهای ضد قارچی و کاهش سرکوب ایمنی می باشد(۲۴). با جراحی ضایعات قارچی برداشته می‌شود که معمولا در درمان سینوزیت ناشی از آسپرژیلوس و آسپرژیلوزیس سیستم عصبی مرکزی Central Nervous System (CNS) به کار برده می‌شود. هر چند که به طور رایج به دلیل تمایل به خونریزی استفاده نمی‌شود(۲۵). سه گروه از داروهای ضد قارچی برای درمان آسپرژیلوزیس تهاجمی مورد استفاده قرار می‌گیرند: پلی ان ها، آزول‌ها و اکینوکاندین‌ها. انتخاب دارو ابتدا بر اساس شواهد به‌دست آمده از مطالعات بالینی و هم‌چنین در صورت امکان با تشخیص گونه قارچی صورت می‌گیرد. پرکاربردترین داروی گروه پلی ان، آمفوتریسین B می‌باشد که با فرمولاسیون‌های مختلفی برای بالا بردن اثربخشی و تحمل آن تولید شده است(۲۶). پلی ان ها با اتصال به ارگوسترول غشای سلول قارچی باعث نفوذ ترکیبات سلولی و تغییر فشار اسمزی و لیز سلول می‌شوند. دومین مکانیسم اثر پلی ان ها شامل آسیب اکسیداتیو به سلول با اکسیداسیون دارو می‌باشد(۲۷).

آمفوتریسین B معمولی، مدت طولانی به عنوان تنها داروی ضد قارچی موجود برای درمان IA مورد استفاده قرار می‌گرفت. اخیرا فرمول لیپیدی آن با توکسیسیتی کم‌تر و حفظ تأثیر دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد. فرمول لیپیدی آن شامل آمفوتریسین ب لیپوزومال، آمفوتریسین ب کولوئید می‌باشد. آمفوتریسین ب لیپوزومال برای درمان اولیه آسپرژیلوزیس تهاجمی مؤثر می‌باشد و به عنوان داروی مهم برای بیمارانی که درمان وریکونازول در آن‌ها موفقیت‌آمیز نبوده است و یا کسانی که تحمل دارویی آن‌ها کم است مورد استفاده قرار می‌گیرد(۲۸). داروهای آزولی به دو گروه عمده تقسیم می‌شوند: ایمیدازول‌ها که بیش‌ترین موارد استفاده را داشته و تری آزول‌ها که هدف دارویی آن‌ها در قارچ‌ها بیش‌ترین شباهت را به آنزیم Cyp450 پستانداران دارد (تصویر شماره ۱). امروزه برای درمان یا پروفیلاکسی IA ترکیبات آزولی نقش بسیار مهمی دارند به استثنا فلوکونازول که هیچ فعالیتی در مقابل *آسپرژیلوس فومیگاتوس* از خود نشان نمی‌دهد. آزول‌ها رشد سلول قارچی را با مهار یک آنزیم در مسیر سنتز ارگوسترول متوقف می‌کنند. آنزیم لانسترول ۱۴α دمتیلاز توسط ژن *Cyp51* در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* کد می‌شود. گروه نیتروژن حلقه آزولی با گروه آهن موجود در مرکز پروتئین Cyp51A باند می‌شود. بنابراین سنتز استرول را در مرحله استرول ۱۴ آلفا دمتیلاز متوقف می‌کند. در نتیجه استرول‌های دمتیله جایگزین ارگوسترول می‌شود و به دنبال تجمع استرول‌های سمی در سلول، مهار رشد سلول قارچی رخ می‌دهد(۳۰،۲۹). آزول‌ها بزرگترین کلاس ترکیبات ضد قارچی هستند و عمل فانژیستاتیکی دارند. این داروها به صورت وریدی یا خوراکی مورد استفاده قرار گیرند. وریکونازول یک طیف وسیعی از آزول‌های سنتز شده مشتق از فلوکونازول می‌باشد و امروزه به طورفراوانتری نسبت به آمفوتریسین ب و بقیه داروهای ضد قارچی برای درمان IA اولیه مورد استفاده قرار می‌گیرد(۳۲،۳۱). پسوکونازول در بیماران نوتروپنیک و پیوندی برای جلوگیری از آسپرژیلوزیس تهاجمی می‌تواند مؤثر باشد(۳۴،۳۳). اکینوکاندین‌ها لیپوپپتیدهایی هستند که برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ وقتی که فعالیت ضد قارچی پپتیدهای طبیعی آشکار شد کشف گردید(۳۵). سه گروه دارویی در این دسته قرار می‌گیرد: کاسپوفانژین، میکافانژین، آنیدولوفانجین(۳۶). هدف این داروها β-Dglucan ۱/۳ سنتتاز است که در سلول‌های پستانداران وجود ندارد. اکینوکاندین‌ها در سنتز پلی‌ساکارید β-Dglucan ۱،۳ دخالت می‌کنند. آزول‌ها و اکینوکاندین ها هر دو دارای مکانیسم مشابه‌ای هستند. هر دوگروه دارویی با مهار سنتز آنزیم‌های ضروری مسیر سنتز دیواره سلولی عمل می‌کنند. مهار سنتز β-Dglucan ۱،۳ باعث استرس در دیواره سلول و تخریب آن می‌شود. کاسپوفانژین در مقابل گونه‌های آسپرژیلوس فعالیت فانژیستیکی دارد(۳۷). این دارو برای درمان IA مؤثر می‌باشد ولی در درمان‌های تجربی نسبت به آمفوتریسین ب اثرات متغیری نشان داده است(۳۸، ۳۹).



الف



ب

تصویر شماره ۱: ساختمان شیمیایی (الف)ایتراکونازول (ب) وریکونازول

تعیین و تفسیر تست‌های مقاومت های دارویی:

اگر چه مقاومت نسبت به برخی داروها در بین گونه‌های مختلف قارچ‌های بیماری‌زا که منجر به مرگ می‌شوند در مطالعات آزمایشگاهی مشاهده شده(۴۵-۴۱)، از جمله این قارچ‌ها می‌توان به گونه‌های آسپرژیلوس اشاره کرد که در عین حال پدیده‌ای غیر رایج است ولی نکته قابل توجه، افزایش مقاومت دارویی به ترکیبات آزولی در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در سال‌های اخیراست(۵۰-۴۶). شرایط میزبان و حساسیت ایزوله‌ها، نقش اساسی در نتیجه درمان دارد. تعیین کم‌ترین غلظت بازدارندگی Minimum Inhibitory Concentration (MIC) به‌طور روتین در آزمایشگاه‌های کلینیکی انجام نمی شود و در نتیجه یک استاندارد (Break point : نقطه مناسب خوانش) برای داروهای ضد قارچی وجود ندارد. شرایط فارماکوکنیتیک و فارماکودینامیک، عوامل و نتایج کلینیکی مطالعات، ارتباط مستقیم MIC ایزوله‌ها را با نتیجه درمان بیماران نشان می‌دهد. در این میان مشکلاتی در ایجاد یک استاندارد Break point برای آسپرژیلوس وجود دارد که شامل میزان دریافت بالا و متغیر داروهای آزول، میزان پایین مثبت بودن کشت، فقدان مارکرهای اختصاصی برای تعیین فرایند بیماری و شرایط زمینه‌ای بیمار از جمله مشکلات در این زمینه می‌باشد. استفاده از توزیع اپیدمیولوژیکال MIC درتعیین یک break point برای ایزوله‌های وحشی Wild Type و میزان مقاومت ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین تخمین ژنوتایپ مقاومت به خصوص برای جهش‌های خاص ضروری می‌باشد. از روش‌های استاندارد برای تعیین تست حساسیت دارویی EUCAST و CLSI در آزمایشگاه استفاده می‌شود(۵۱، ۵۲).

مقاومت داروهای ضد قارچی در آسپرژیلوس فومیگاتوس

اساس مولکولی گسترش مقاومت داروهای ضد قارچی به طور دقیق شناسایی نشده است و شناخت علت وقوع و گسترش آن ضروری می‌باشد. در پلی انها شامل ترکیبات ضد قارچی آمفوتریسین ب گسترش مقاومت به وسیله *آسپرژیلوس فومیگاتوس* یک پدیده رایج است(۵۳). پلی ان ها نفروتوکسیسیتی بالایی دارند و فعالیت اکینوکاندین‌ها در مقابل *آسپرژیلوس فومیگاتوس* محدود می‌باشد و به صورت خوراکی مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. داده‌های اپیدمیولوژی مقاومت برای اکینوکاندینها که اخیرا برای درمان عفونت با عامل *آسپرژیلوس فومیگاتوس* مورد استفاده قرار می‌گیرند به ندرت گزارش شده است. اگر چه جهش در ژن FKS1 و بیان بیش از حد این ژن (هر دو عامل) در ارتباط با مقاومت اکینوکاندین‌ها گزارش شده است(۵۵،۵۴). بیش‌ترین مقاومت مشاهده شده مقاومت ترکیبات آزولی می‌باشد که در واقع این کلاس دارویی در طول درمان‌های ضد قارچی به صورت طولانی مدت مورد استفاده قرار گرفته است. نتایج درمان IA با یک ایزوله مقاوم به آزول موضوع بسیار مهمی است که باید به آن توجه شود.

اپیدمیولوژی مقاومت به داروهای آزول:

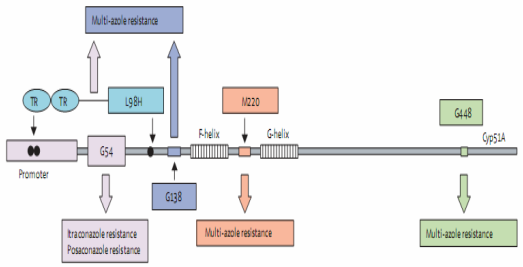
آسپرژیلوس فومیگاتوس به طور ذاتی به فلوکونازول و کتوکونازول مقاوم می‌باشد(۵۶). مقاومت اولیه *آ. فومیگاتوس* به دیگر عوامل ضد قارچی گزارش نشده است اگر چه کاهش حساسیت آن‌ها درگروه *آسپرژیلوس فومیگاتی* بررسی شده است(۵۷). این گونه‌های جدید از نظر مورفولوژی بسیار شبیه *آسپرژیلوس فومیگاتوس* هستند و به طورمعمول در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی از *آسپرژیلوس فومیگاتوس* قابل تشخیص نیستند. اما تعدادی گونه جدید شناسایی شدند که باعث عفونت در انسان می‌شوند و در مقایسه با *آسپرژیلوس فومیگاتوس* فنوتایپ مقاومت بیش‌تری را نشان می‌دهند. مانند *Neosartorya pseudofischeri* (آنامورف *A. thermomutatus*)، *A. lentulus*، *A. undagwae* (۵۸، ۵۹). علاوه بر استرین‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* مقاوم به آزول‌ها در آزمایشگاه، مقاومت در

ایزوله‌های کلینیکی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* که یک پدیده نادر است نیز گزارش شده است. با توجه به این که تست حساسیت داروهای ضد قارچی به عنوان یک روش روتین استاندارد در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی انجام نمی شود، بیش‌تر مطالعات به صورت انفرادی گزارش شده است. اگر چه چندین مطالعه به صورت مجموعه‌ای انجام شده است و میزان ایزوله‌های مقاوم *آسپرژیلوس فومیگاتوس* برای سال‌ها پایین بوده اما اخیراً ظهور مقاومت چندگانه (Multi Azole Resistance) در این گونه قارچی در کشور هلند روند صعودی داشته است(۵۰،۶۰). یکی از مکانیسم‌های جهش جایگزینی هیستیدین در کدون ۹۸ به جای لوسین در ژن Cyp51A به همراه دو کپی از یک سکانس ۳۴ جفت بازی در ناحیه پروموتور (TR/L98H) می‌باشد(تصویر شماره ۲). گزارشات حاکی از آن است که مقاومت به ترکیبات آزول در سال‌های ۲۰۰۹-۲۰۰۸ در هلند یک سیر صعودی را به همراه داشته است. در میان ایزوله‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* محیطی مقاومت آزولی با مکانیسم (TR/L98H) مشاهده گردیده است(۴۰). البته قابل ذکر است ایزوله‌های مقاوم تنها در نمونه خاک کشاورزی (نه در خاک طبیعی) یافت شدند(۶۱). ظهور (TR/L98H) به عنوان یک مکانیسم مقاومتی، یک مشکل کلینیکی و عمومی برای سلامت در کشور هلند می باشد. در مورد گسترش مقاومت دارویی در سایر کشورها اطلاعات کمی وجود دارد. اگر چه این مسأله نمی‌تواند دلیل بر شیوع پایین مقاومت و یا عدم آن در این کشورها باشد. ایزوله‌های *آسپرژیلوس* مقاوم به آزول به صورت پراکنده در دیگر کشورهای اروپایی از قبیل فرانسه، انگلستان، بلژیک و دانمارک گزارش شده است که نشان می‌دهد مقاومت می‌تواند گسترده تر از اطلاعات موجود باشد(۶۲). لازم به ذکر است که ایزوله‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* مقاوم به آزول برای اولین بار از ایران در جدول شماره ۲ گزارش شده است(۶۳).

جدول شماره ۲: نتایج بررسی اپیدمیولوژیکال ایزوله های مقاوم آزولی در آسپرژیلوس فومیگاتوس

نام محقق (سال تحقیق)	تعداد ایزوله های بررسی شده	تعداد ایزوله های مقاوم	آزول مورد بررسی	کشور مورد بررسی	منبع
Chryssanthou et al(1997)	۱۰۷	۳	ITZ	سوئد	۸۶
Verweij et al . (1998)	۱۳۰	۱	VCZ>4μg/l	هلند	۸۷
Dannaoui et al . (1999)	۱۵۶	۴	ITZ>16μg/l	فرانسه	۸۸
Verweij et al . (2002)	۱۷۰	۳	ITZ	هلند	۸۹
Mosquera et al . (2002)	۱۷	۱۱	ITZ>4μg/l	انگلستان	۹۰
Dannaoui et al . (2004)	۲۰۰	--	ITZ	فرانسه , ایتالیا	۵۳
Pfaller et al. (2005)	۳۳۱	---	ITZ	جهانی	۹۱
Hsueh et al. (2005)	۴۰	۲	ITZ≥2μg/l	تایوان	۹۲
Guinea et al. (2008)	۳۷۴	--	VCZ	اسپانیا	۹۳
Snelders et al. (2008)	۱۹۱۲	۳۲	ITZ≥16μg/l	هلند	۵۰
Rodriguez-Tudela et al .(2008)	۳۹۳	۳۲	ITZ≥16μg/l	اسپانیا , هلند	۹۴
Espinel- Ingroff et al .(2008)	۲۹۲	۱	VCZ≥2μ g/l	انگلستان ,فرانسه	۹۵
Howard et al .(2009)	۵۱۹	۳۴	ITZ	آمریکای شمالی	۴۷
Pfaller et al. (2009)	۶۳۷	۴۳	ITZ≥2μg/l	انگلستان	۹۶
Baddley et al. (2009)	۱۸۱	۱	ITZ≥4μg/l	جهانی	۹۷
Amorim et al. (2010)	۱۵۹	۱	PCZ>0.25	پرتقال	۹۸
Bueid et al. (2010)	۲۳۰	۶۲	ITZ≥4μg/l	انگلستان	۹۹
Anuradha Chowdhary et al(2012	۴۸۶	۴۴	ITZ≥16μg/l	هند	۱۰۰
Shawn R Lockhart et al, 2012	497	29	ITZ>16, VOR, POS	چین	۱۰۱
Badalii et al .(2013)	150	4	ITZ≥16μg/l	ایران	۶۳

– ITZ(Itraconazole) : ایتراکونازول
– POC (posaconazole) : پوسوکونازول
– VOR (voriconazole) : وریکونازول



تصویر شماره ۲ : مکانیسم مقاومت به داروهای آزول مرتبط با ژن *cyp51A* در *آسپرژیلوس فومیگاتوس*(۶۵،۶۴)

مقاومت به داروهای آزول و جهش ها :

مکانیسم مقاومت دارویی در قارچ‌ها به ۲ دسته تقسیم می‌شود : ۱- مکانیسم‌های انتشار دارو به خارج سلول ۲- تغییر در آنزیم به وسیله جهش‌های اختصاصی و یا بیان بیش از حد یک ژن(۶۶). ژن‌های مسئول انتقال دهنده مواد به خارج سلول در گونه‌های آسپرژیلوس متعدد می‌باشند. به نظر می‌رسد ژنوم *آسپرژیلوس فومیگاتوس* دارای حداقل ۴۹ ABC از خانواده انتقال دهنده‌ها Transfer و ۲۷۸ ژن از خانواده تسهیل کننده‌ها Facilitator باشد. با بیان بیش از حد پمپ انتقال دهنده دارو، آزول‌ها به طور فعال از سلول قارچی خارج می‌شوند و در نتیجه از مهار آنزیم α ۱۴- دی متیلاز جلوگیری می‌شود. علاوه بر دو مکانیسم ذکر شده اخیراً ژن‌های جدیدی در ارتباط با مقاومت دارویی ضد قارچی شناسایی شده است. در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* دو پروتئین تنظیمی که توسط ژن‌های *SrbA* و *HacA* کد می‌شوند به نظر می‌رسد مسوول مکانیسم‌های مقاومت ضد قارچی باشند(۶۸،۶۷). بسیاری از مطالعات ارتباط مستقیمی را بین جهش‌های نقطه‌ای خاص در *Cyp51A* و مقاومت آزولی در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* نشان داده‌اند. در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* ۲ محدوده ژنی نزدیک و مرتبط به هم وجود دارد (*Cyp51B,Cyp51A*) این دو محدوده ژنی در ۶۳ درصد سکانس‌های شناخته شده برای پروتئین Cyp51 یکسان هستند(۶۹،۵۶). مطالعات روی پیوند آزولی نشان داده که فلوکونازول ضعیف‌ترین پیوند را با *Cyp51A/B* دارد که می‌تواند دلیل عملکرد ضعیف این دارو علیه ایزوله‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* باشد. مطالعات نشان داده است که *Cyp51A* پیوند محکم‌تری را با ترکیبات آزولی نسبت به *Cyp51B* ایجاد می‌کند و به طور معمول حساسیت بیش‌تری نسبت به ترکیبات آزولی دارد(۵۶). Cyp51A کد کننده آنزیم α ۱۴- دی متیلاز، برای رشد قارچ ضروری می‌باشد و *Cyp51B* در شرایط خاص رشد و با عملکرد آلترناتیو، نقش خود را ایفا می‌کند(۵۶). اما سوالی که در این‌جا ایجاد می‌شود این است که چرا اکثر جهش‌ها در ایزوله‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* مقاوم به آزول در ژن *Cyp51A* گزارش شده است در صورتی که تا به حال هیچ جهشی مرتبط با مقاومت آزولی در *Cyp51B* پیدا نشده است(۵۶،۷۰). در یوکاریوت‌ها ژن *Cyp* پروتئین‌هایی را که به فراوانی در شبکه آندوپلاسمی و غشا داخلی میتوکندری وجود دارد را کد می‌کند(۷۱). ناحیه N- ترمینال درآنزیم α ۱۴- دی متیلاز در کاندیدا آلبیکنس در فضای بین غشا در قسمت سیتوپلاسمیک آن قرار دارد که یک تشابه ساختاری و هیدروفوبیسیتی مشابه *Cyp51A* در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* را نشان می‌دهد و به نظر می‌رسد که نقش مشابهی را داشته باشند(۷۳،۷۲). سه مطالعه متفاوت توسط کریستالوگرافی X-ray با پروتئین *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و یک مدل ۳ بعدی *Cyp51A* بیانگر آن است که همه مدل‌ها یک کانال ورودی لیگاند شده را در پروتئین *Cyp51A* نشان داده‌اند(۷۶-۷۴). این کانال‌ها در غشا رتیکولوم اندوپلاسمیک قرار گرفته‌اند و با چسبیدن میزان بالایی از سوبستراهای استرولی لیپوفیلیک همراه ترکیبات آزولی به این کانال‌ها، دستیابی دیگر متابولیت‌ها به کانال‌های مذکور متوقف می‌گردد(۵۶). ترکیبات آزولی می‌توانند به مولکول آهن فعال در مرکز *Cyp51A* باند شوند و عملکرد آنزیمی آن‌را مهار کنند. تفاوت در جایگزینی آمینواسیدهای کدون ۵۴، ۱۳۸، ۹۸، ۲۲۰ و ۴۴۸ در ایزوله‌های کلینیکی و آزمایشگاهی باعث ایجاد ایزوله‌های مقاوم *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به یک یا چند

ترکیب آزولی شده است. به نظر می‌رسد کدون ۵۴ و ۲۲۰ در ورود ترکیبات آزولی به کانال‌ها برای دستیابی لیگاند اختلال ایجاد می‌کنند. یک ناحیه تکراری ۳۴ جفت بازی ناحیه پروموتور در ایجاد مقاومت آزولی در قارچ‌های پاتوژن گیاهی شرکت می‌کند که این ناحیه تکراری Tandem Repeat در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* هم یافت شده است(۶۴). رونویسی یک ناحیه ۳۴ جفت بازی در ناحیه پروموتور باعث افزایش بیان ژن *Cyp51A* می شود که اساساً کاهش در حساسیت آزولی را به دنبال دارد. آنالیز ترکیبات نشان می‌دهد که ناحیه تکراری پروموتور برای فنوتایپ کامل مقاومت کافی نیست، هم‌چنین جهش L98H (جایگزینی هیستیدین در کدون ۹۸ با لوسین) نیز به تنهایی نقشی در مقاومت ندارد. تنها زمانی فنوتایپ مقاومت آزولی چند گانه Multi Azole Resistant (MAR) مشاهده می‌گردد که هر دو جهش هم‌زمان رخ دهد (TR/L98H) (۴۹). جابه‌جایی در اسیدهای آمینه دیگر در Cyp51A نیز گزارش شده که تعدادی از آن‌ها در ایزوله‌های حساس یافت شده‌اند. ذکر این نکته ضروری است که در بعضی از ایزوله‌های مقاوم به ترکیبات آزولی هیچ‌گونه جهشی در ژن *Cyp51A* یافت نشده است(۷۶). بنابراین انجام آزمایشات ترکیبی برای تأیید این مسأله که کدام اسید آمینه باعث ایجاد مقاومت آزولی در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* می‌شود و چگونگی مکانیسم عمل آن ضروری به نظر می‌رسد(۴۸،۴۹).

تکامل در مقاومت به داروهای آزول :

گسترش مقاومت در ویروس‌ها و باکتری‌ها یک پدیده شناخته شده است ولی در مورد قارچ‌های پاتوژن یک رویداد نو می‌باشد. در اواسط ۱۹۹۰ در بیماران مبتلا به عفونت اروفارنژیال کاندیدایی (دارای بیماری زمینه ایی ایدز) در حدود ۳۰ درصد ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس، مقاوم به داروهای آزولی گزارش شدند. این مسأله نشان داد که قارچ‌ها توانایی به دست آوردن مکانیسمی که نسبت به داروهای ضد قارچی مقاوم شوند را دارند(۷۷). در ایزوله‌های حساس تحت شرایط مناسب مکانیسم مقاومت در اثر مواجهه با داروهای ضد قارچی می‌تواند گسترش یابد. به نظر می‌رسد که ایزوله‌های مقاوم در اثر مواجهه با ترکیبات ضد قارچی به صورت انفرادی در بیماران به دست می‌آید و قارچ های پاتوژن نمی‌توانند مقاومت را انتقال دهند(۷۸). علاوه بر این یک دلیل گسترش مکانیسم مقاومت منفرد TR/L98H در ایزوله‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* استفاده از ترکیبات ضد قارچی در طبیعت می‌باشد. در بیمارانی که به مدت طولانی با ترکیبات آزولی درمان شده‌اند ایزوله‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* مقاوم به آزول در کدون ۵۵، ۱۳۸، ۲۲۰ جهش نقطه ای داشتند. به نظر می‌رسد این جهش‌ها در ایزوله‌های کلینیکی به وجود آمده است و حضور TR (ناحیه تکرار شونده در پروموتور) یک مکانیسم مهم در قارچ‌های پاتوژن گیاهی محسوب می‌شود. از آن‌جا که قارچ‌های پاتوژن گیاهی مقاوم به ترکیبات ضد قارچی بازدارنده استرول دمتیلاز شناسایی شده اند و زیستگاه طبیعی شان با *آ. فومیگاتوس* یکسان می‌باشد هنگامی که با تماس مداوم و شدید فانژیسیدها مواجه گردند می‌توانند باعث گسترش مقاومت در محیط شوند. مقاومت متقاطع Cross-Resistant با آزول‌های پزشکی یک مسئله بسیار مهم می‌باشد(۴۰،۷۹،۸۰) میزان مصرف ترکیبات ضد قارچی محیطی در کشور هلند تقریباً ۳۵۰ برابر بیش‌تر از آزول‌های مصرفی در پزشکی می‌باشد و در کشور دانمارک این نسبت بالاتر است(۶۲،۶۴). تست حساسیت ضد قارچی ایزوله‌های TR/L98Hو ایزوله‌های وحشی Wild Type کلینیکی و محیطی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* یک مقاومت متقاطع با تبوکونازول و متکونازول (آزول‌های محیطی) را نشان داده است که می‌تواند باعث تشدید گسترش مقاومت شود(۶۱). به طور معمول یک جهش باعث عدم تناسب می‌شود(۷۹). پس مکانیسم مقاومت TR/L98H به نظر نمی‌رسد باعث ایجاد تناسب یا نظم خاصی در قارچ

شود(۸۱). اخیراً سیکل جنسی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* شرح داده شده است که این پدیده می‌تواند جهش های موجود را به نسل بعد انتقال دهد و ایجاد یک جمعیت قارچی با مکانیسم جدید نماید و یا آن را لغو کند(۸۲). ایزوله‌های TR/L98H که از ۱۲ سال پیش گزارش شده است نشان می‌دهد که جهش در این ایزوله‌ها باعث نا کارآمدی و عدم تناسب این ایزوله‌ها در مقابل سوش وحشی نشده است. چون ما با گسترش ایزوله‌های کلینیکی و محیطی این مکانیسم مقاوم در سال‌های اخیر مواجه بودیم با یافتن ایزوله‌های TR/L98H در بیماران بدون سابقه درمان با آزول به نظر می‌رسد محیط می‌تواند در ایجاد مقاومت، نقش اصلی را به عهده داشته باشد(۶۰). به دلیل تظاهر دیگر مکانیسم‌های مقاومت شناخت روند تکاملی مقاومت آزولی بسیار مهم است. اخیراً یک مکانیسم مقاومت جدید از ایزوله‌های کلینیکی در هلند که دارای یک ناحیه ۴۶جفت بازی در ناحیه TR به همراه ۲ جهش در ژن Cyp51A می‌باشد مشاهده شده است(۸۳). این مکانیسم جدید مقاومت در بیماران بدون درمان قبلی با آزول نشان می‌دهد که منشا مکانیسم می‌تواند محیطی باشد. بنابراین یافتن ارتباط فانژیسیدهای محیطی و گسترش مقاومت در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و تهدید سلامتی در افراد مستعد با استفاده از فانژیسیدهای کلاس آزولی بسیار مهم می‌باشد. محدودیت استفاده از فانژیسیدها ممکن است باعث کاهش بروز مقاومت شود و از گسترش یک مکانیسم مقاومت جدید در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جلوگیری کند اما جلوگیری از گسترش TR/L98H و دیگر مکانیسم‌ها شاید ممکن نباشد. به نظر می‌رسد گسترش ایزوله *آسپرژیلوس*های TR/L98H در دیگر کشورهای اروپایی وآسیاییاز جمله هند، چین و ایران رو به افزایش باشد.

بحث

مقاومت آزولی در شرایط خاص از قبیل درمان آزولی افراد مبتلا به آسپرژیلوزیس به صورت مزمن، به خصوص آسپرژیلوما، در حال گسترش می‌باشد. هم‌چنین مواجهه با فانژیسیدهای آزولی که در محیط استفاده می‌شوند در گسترش مقاومت بسیار مهم است. به لحاظ این‌که تست‌های حساسیت دارویی به صورت روتین در آزمایشگاه‌ها انجام نمی‌گیرد پس شیوع گزارش شده می‌تواند پایین‌تر از میزان مقاومت واقعی باشد. مکانیسم‌های مقاومت شناخته شده از نظر مولکولی متفاوت می‌باشند ولی از لحاظ فنوتایپی مقاومت یکسان را نشان می‌دهند. از عوامل ایجاد کننده مقاومت، انتشار دارو به خارج از سلول، بیان بیش از حد آنزیم هدف و تغییرات اختصاصی آنزیم هدف برای *آسپرژیلوس فومیگاتوس* عنوان شده است. نحوه شکل‌گیری مقاومت آزولی در مکانیسم‌های مختلف هنوز به طور کامل شناسایی نشده است. در بیماران مبتلا به آسپرژیلوزیس مهاجم که از آزول‌ها برای درمان یا به صورت پروفیلاکسی استفاده می‌کنند احتمال وقوع مقاومت بسیار بالاست و کنترل آن در این بیماران نقش حیاتی دارد. باتوجه به تعداد محدود داروهای ضدقارچی موجود و همین طور معضلاتی که درتشخیص آسپرژیلوزیس تهاجمی وجود دارد اضافه شدن پدیده مقاومت آزولی می‌تواند درمان این بیماری را با مشکلات بسیار بیش‌تری روبرو می‌نماید. ایزوله‌های وحشی در اثر مواجهه با داروهای آزولی در طی درمان و یا در محیط توسط فانژیسیدها، در نتیجه مقاومت متقاطع با آزول های کلینیکی به ایزوله‌های مقاوم تبدیل می‌شوند و یک گسترش مقاومت ایجاد خواهد شد. در مراکز درمانی اولین انتخاب درمانی برای یک بیمار با نقص ایمنی مبتلا به عفونت قارچی، ترکیبات آزولی می‌باشد. که در نتیجه گسترش مقاومت به صورت کلینیکی یا محیطی، پیامد آن شکست درمان می‌باشد و بیماری، تبدیل به عفونت منتشره می‌گردد. کنترل گسترش مکانیسم‌های مقاومت و ظهور مکانیسم‌های جدید مهم است زیرا مقاومت می‌تواند در سایر قارچ‌های فرصت طلب از قبیل موکور و سایر گونه‌های

آسپرژیلوس روی دهد. علاوه بر این وجود ارتباط بین استفاده از فانژیسیدهای آزولی و گسترش مقاومت با آزول‌های پزشکی، علت گسترش و ظهور مقاومت آزولی در هلند و برخی از کشورهای اروپایی بیان شده است. گسترش سریع ابزارهای تشخیصی، برای تشخیص زودهنگام بیماری و مقاومت در موارد که نتیجه کشت منفی است، ضروری به نظر می‌رسد. اما ابزارهای تشخیصی موجود برای موارد با کشت مثبت می‌باشد(۸۴،۸۵). هم‌چنین تولید یک سری داروهای جدید با عملکرد جدید و ترجیحاً، به صورت خوراکی وتزریقی بسیار ضروری به نظر می‌رسد. در مناطق با شیوع بالای مقاومت دارویی، درمان های اولیه باید ارزیابی مجدد شود. شواهد موجود در تکامل مکانیسم‌های آزولی به وسیله مهارکننده‌های دمتیلاسیون در ایزوله‌های TR/L98H بر کنترل جدی در مصرف قارچ‌کش‌ها تأکید می‌کند. تعیین مکانیسم مقاومت آزولی ایزوله‌های آسپرژیلوس در سطح گونه، با استفاده از تست حساسیت ضد قارچی و سکانس ژن Cyp51A صورت می‌گیرد. به دلیل خاصیت نفروتوکسیسیتی پلی ان ها و محدودیت فعالیت اکینوکاندین ها در مقابل *آسپرژیلوزیس فومیگاتوس* و عدم وجود آن‌ها به صورت خوراکی در بازار، نتیجه درمان آسپرژیلوزیس تهاجمی با یک ایزوله مقاوم به آزول از اهمیت بالایی برخوردار است. شناخت تکامل مقاومت به داروهای آزول به علت مواجهه مستمر آزول های محیطی و در حال گسترش بودن دیگر مکانیسم‌های مقاومت، به طور قابل توجهی مهم است.

References

1. Chandrasekar PH, Alangaden G, Manavathu E. *Aspergillus:* an increasing problem in tertiary care hospitals? Clin Infect Dis 2000; 30(6): 984-985.
2. Zaini F, Hedayati MT. Study of airborne fungi spores in the wards of 3 Tehran hospitals. Journal of Medical Council of Islamic Republic of Iran 1995; 13(3): 208-215.
3. Young RC, Bennett JE, Vogel CL, Carbone PP, DeVita VT. Aspergillosis. The spectrum of the disease in 98 patients. Medicine 1970; 49(2): 147-173.
4. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 12(2): 310-350.
5. Samson RA, Hong S, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J. Polyphasic taxonomy of Aspergillus section Fumigati and its teleomorph Neosartorya. Stud Mycol 2007; 59: 147-203.
6. Hohl TM, Feldmesser M. Aspergillus fumigates: Principles of pathogenesis and host defense. Eukaryot Cell 2007; 6(11): 1953-1963.
7. Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive Aspergillosis. Clin Microbiol Rev 2009; 22(3): 447-465.
8. Maschmeyer G, Haas A, Cornely OA. Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. Drugs 2007; 67(11): 1567-1601.
9. Verweij PE, Denning DW. The challenge of invasive aspergillosis: increasing numbers in diverse patient groups. Int J Infect Dis 1997; 2(2): 61-63.
10. Wouter M, Katrien L, Johan M. Invasive Aspergillosis in the Intensive Care Unit. Clin Infect Dis 2007; 45(2): 205-215.
11. Patterson TF. Advances and challenges in management of invasive mycoses. Lancet 2005; 366: 1013-1025.
12. VandenBergh MF, Verweij PE, Voss A. Epidemiology of nosocomial fungal infections: invasive aspergillosis and the environment. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34 (3): 221-227.

13. Engelich G, Wright DG, Hartshorn KL. Acquired disorders of phagocyte function complicating medical and surgical illnesses. Clin Infect Dis 2001; 33(12): 2040-2048.
14. Maschmeyer G, Haas A, Cornely OA. Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. Drugs 2007; 67(11): 1567-1601.
15. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K, et al. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. J Infect 1996; 33(1): 23-32.
16. Lin SJ, Schranz J, Teutsch S. Aspergillosis case–fatality rate: systematic review of the literature. Clin Infect Dis 2001; 32(3): 358-366.
17. Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden E. Invasive Aspergillosis in Critically Ill Patients without Malignancy. Am J Respir Crit Care Med 2004; 170(6): 621-625.
18. Vandewoude KH, Vogelaers D, Blot S. Aspergillosis in the ICU-The new 21st century problem? Med Mycol 2006; 44(s1): 71-76.
19. Senn L, Robinson JO, Schmidt S, Knaup M, Asahi N, Satomura S, et al. 1,3-Beta-D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. Clin Infect Dis 2008; 46(6): 878-885.
20. White PL, Bretagne S, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, Schulz B, et al. Aspergillus PCR: one step closer to Standardization. J Clin Microbiol 2010; 48(4): 1231-1240.
21. Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2009; 9(2): 89-96.
22. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis 2008; 46(12): 1813-1821.
23. Ullmann AJ, Cornely OA. Antifungal prophylaxis for invasive mycoses in high risk patients. Curr Opin Infect Dis 2006; 19(6): 571-576.
24. Groll AH, Gea-Banacloche JC, Glasmacher A, Just-Nuebling G, Maschmeyer G, Walsh TJ. Clinical pharmacology of antifungal compounds. Infect Dis Clin North Am 2003; 17(1): 159-191.
25. Bernard A, Caillot D, Couaillier JF, Casasnovas O, Guy H, Favre JP. Surgical management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. Ann Thorac Surg 1997; 64(5): 1441-1447.
26. Donovick R, Gold W, Pagano JF, Stout HA. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. Antibiot Annu 1955; 3: 579-586.
27. Sokol-Anderson M, Sligh JE Jr, Elberg S, Brajtburg J, Kobayashi GS, Medoff G. Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of Candida albicans to the killing effect of amphotericin B. Antimicrob Agents Ch 1988; 32(5): 702-705.
28. Groll AH, Piscitelli SC, Walsh TJ. Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: A comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds,

and putative targets for antifungal drug development. Adv Pharmacol 1998; 44: 343-500.

29. Vanden Bossche H, Koymans L, Moereels H. P450 inhibitors of use in medical treatment: focus on mechanisms of action. Pharmacol Ther 1995; 67(1): 79-100.
30. Waterman MR, Lepesheva GI. Sterol 14 alpha-demethylase, an abundant and essential mixed-function oxidase. Biochem Biophys Res Commum 2005; 338(1): 418-422
31. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. N Engl J Med 2002; 347(6): 408-415.
32. Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. Clin Infect Dis 2008; 46(2): 201-211.
33. Cornely OA, Maertens J, Winston DJ, Perfect J, Ullmann AJ, Walsh TJ, et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. N Engl J Med 2007; 356(4): 348-359.
34. Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, Chandrasekar P, Langston A, Tarantolo SR, et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. N Engl J Med 2007; 356(4): 335-347.
35. Debono M, Abbott BJ, Turner JR, Howard LC, Gordee RS, Hunt AS, et al. Synthesis and evaluation of LY121019, a member of a series of semisynthetic analogues of the antifungal lipopeptide echinocandin B. Ann NY Acad Sci 1988; 544: 152-167.
36. Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. Lancet 2003; 362(9390): 1142-1151.
37. Bowman JC, Hicks PS, Kurtz MB, Rosen H, Schmatz DM, Liberator PA, et al. The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus in vitro*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(9): 3001-3012.
38. Maertens JA, Madero L, Reilly AF, Lehrnbecher T, Groll AH, Jafri HS, et al. A randomized, double-blind, multicenter study of caspofungin versus liposomal amphotericin B for empiric antifungal therapy in pediatric patients with persistent fever and neutropenia. Pediatr Infect Dis J 2010; 29(5): 415-420.
39. Steinbach WJ. Invasive aspergillosis in pediatric patients. Curr Med Res Opin 2010; 26(7): 1779-1787.
40. Meneau I, Sanglard D. Azole and fungicide resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med Mycol* 2005; 43(Suppe 1): S307-S311.
41. Deng S, de Hoog GS, Badali H, Yang L, Najafzadeh MJ, Pan B, Cet al. In vitro antifungal susceptibility of Cladophialophora carrionii, an agent of human chromoblastomycosis. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(4): 1974-1977.
42. Badali H, de Hoog GS, Curfs-Breuker I, Andersen B, Meis JF. *In vitro* activities of eight antifungal drugs against 70 clinical and environmental isolates of *Alternaria* species. J Antimicrob Chemother 2009; 63(6): 1295-1297.
43. Badali H, Najafzadeh MJ, Van Esbroeck M, van den Enden E, Tarazooie B, Meis JF, et al. The clinical spectrum of *Exophiala jeanselmei,* with a case report and *in vitro* antifungal susceptibility of the species. Med Mycol 2010; 48(2): 318-327.

44. Badali H, de Hoog GS, Curfs-Breuker I, Klaassen CH. Use of Amplified fragment length polymorphism to identify 42 *Cladophialophora* strains related to cerebral phaeohyphomycosis with *in vitro* antifungal susceptibility. J Clin Microbial 2010; 48(7): 2350-2356.
45. Afsarian MH, Shokohi T, Arzanlou M, Taheri M, Badali H. Phaeohypomycosis due to dematiaceous fungia review of the literatures. J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(92): 108-135.
46. Arendrup MC, Mavridou E, Mortensen KL, Sneiders E, Moller NF, Khan H, et al. Development of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy associated with change in virulence. PLoS ONE 2010; 5(4): e10080.
47. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag Ah, Fisher MC, Pasqualotto AC, et al. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. Emerg Infect Dis 2009; 15(5): 1068-1076.
48. Mellado E, Garcia-Effron G, AlCazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Substitutions at methionine 220 in the 14alpha-sterol demethylase (*cyp*51A) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance *in vitro* to azole antifungal drugs. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(7): 2747-2750.
49. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Melchers WJ, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring *in vitro* cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp*51A alterations. Antimicrob Agents Ch 2007; 51(6): 1897-1904.
50. Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, Amm R, Varga J, Samson R, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. PLoS Med 2008; 5(11): e219.
51. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. 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: 982-984.
52. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, approved standard. 2nd ed. Document M38–A2. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
53. Dannaoui E, Meletiadis J, Tortorano AM, Symoens F, Nolard N, Viviani MA, et al. Susceptibility testing of sequential isolates of *Aspergillus fumigatus* recovered from treated patients. J Med Microbiol 2004; 53(2): 129-134.
54. Arendrup MC, Garcia-Effron G, Buzina W, Morteensen KL, Reiter N, Lundin CH, et al. Breakthrough Aspergillus fumigatus and Candida albicans double infection during caspofungin treatment: laboratory characteristics and implication for susceptibility testing. Antimicrob Agents Ch 2009; 53(3): 1185-1193.
55. Rocha EM, Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS. A Ser678Pro substitution in Fks1p confers resistance to echinocandin drugs in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Ch 2007; 51(11): 4174-4176.
56. Warrilow AG, Melo N, Martel CM, Parker GE, Nes WD, Kelly SL, et al. Expression,

purification and characterization of *Aspergillus fumigatus* sterol 14-alpha demethylase (CYP51) isoenzymes A and B. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(10): 4225-4234.

57. Van Der Linden JW, Warris A, Verweij PE. Aspergillus species intrinsically resistant to antifungal agents. Med Mycol 2011; 49(suppl 1): s82-89.
58. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. Eukaryot Cell 2005; 4(3): 625-632.
59. Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. Eukaryot Cell 2006; 5(10): 1705-1712.
60. Verweij PE, Mellado E, Melchers WJ Multiple-triazole-resistant aspergillosis. N Engl J Med 2007; 356(14): 1481-1483.
61. Snelders E, Huis In't Veld RA, Rijs AJ, Kema GH, Melchers WJ, Verweij PE. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. Appl Environ Microbiol 2009; 75(12): 4053-4057.
62. Mortensen KL, Mellado E, Lass-Florl C, Rodriguez-Tudela JL, Johansen HK, Arendrup MC. Environmental study of azole-resistant Aspergillus fumigatus and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. Antimicrob Agents Ch 2010; 54(11): 4545-4549.
63. Badali H, Vaezi A, Haghani I, Yazdanparast SA, Hedayati MT, Mousavi B, et al. Environmental study of azole-resistant Aspergillus fumigatus with TR34/L98H mutations in the cyp51A gene in Iran. Mycoses 2013; doi: 10.1111/myc.12089.
64. Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? Lancet Infect Dis 2009; 9(12): 789-795.
65. Snelders E, Melchers WJ, Verweij PE. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a new challenge in the management of invasive aspergillosis? Future Microbiol 2011; 6(3): 335-347.
66. Chamilos G, Kontoyiannis DP. Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus*. Drug Resist Updat 2005; 8(6): 344-358.
67. Richie DL, Hartl L, Aimanianda V, Winters MS, Fuller KK, Miley MD, et al. A role for the unfolded protein response (UPR) in virulence and antifungal susceptibility in *Aspergillus fumigatus*. PloS Pathog 2009; 5(1): E1000258.
68. Willger SD, Puttikamonkul S, Kim KH, Burritt JB, Grahl N, Metzler LJ, et al. A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. PLoS Pathog 2008; 4: E1000200
69. Mellado E, Garcia-Effron G, Buitrago MJ, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Targeted gene disruption of the 14-alpha sterol demethylase (*cyp*51A) in *Aspergillus fumigatus* and its role in azole drug susceptibility. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(6): 2536-2538.
70. Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A point mutation in the 14alpha-sterol demethylase gene cyp51A contributes to itraconazole resistance in Aspergillus fumigatus. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(3): 1120-1124.
71. Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story. *Genome*

Biol 2000; 1(6): REVIEWS3003

72. Boscott PE, Grant GH. Modeling cytochrome P450 14 alpha demethylase (*Candida albicans*) from P450cam. J Mol Graph 1994; 12(3): 185-192, 195.
73. Mann PA, Parmegiani RM, Wei SQ, Mendrick CA, Li X, Loebenberg D, et al. Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14a-demethylase. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(2): 577-581.
74. Xiao L, Madison V, Chau AS, Loebenberg D, Palermo RE, McNicholas PM. Threedimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14a-sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(2): 568-574.
75. Gollapudy R, Ajmani S, Kulkarni SA. Modeling and interactions of *Aspergillus fumigatus* lanosterol 14-alpha demethylase 'A' with azole antifungals. Bioorg Med Chem 2004; 12(11): 2937-2950.
76. Snelders E, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Verweij PE, Melchers WJ. Azole resistance profile of amino acid changes in *Aspergillus fumigatus* CYP51A based on protein homology modeling. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(8): 2425-2430.
77. Law D, Moore CB, Wardle HM, Ganguli LA, Keaney MG, Denning DW. High prevalence of antifungal resistance in *Candida* spp. from patients with AIDS. J Antimicrob Chemother 1994; 34(5): 659-668
78. Anderson JB. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. Nat Rev Microbiol 2005; 3(7): 547-556.
79. Hof H. Is there a serious risk of resistance development to azoles among fungi due to the widespread use and long-term application of azole antifungals in medicine? Drug Resist Updat 2008; 11(1-2): 25-31.
80. Hof H. Will resistance in fungi emerge on a scale similar to that seen in bacteria? Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27(5): 327-334.
81. Mavridou E, Bruggemann RJ, Melchers WJ, Mouton JW, Verweij PE. Efficacy of posaconazole against three clinical *Aspergillus fumigatus* isolates with mutations in the *cyp51A* gene. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(2): 860-865.
82. O'Gorman CM, Fuller H, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Nature 2009; 457(7228): 471-474.
83. van der Linden JW, Camps SM, Kampinga GA, Arends JP, Debets-Ossenkopp YJ, Haas PJ, et al. Aspergillosis due to Voriconazole Highly Resistant Aspergillus fumigatus and Recovery of Genetically Related Resistant Isolates From Domiciles. Clin Infect Dis 2013; 57(4): 513-520.
84. Balashov SV, Gardiner R, Park S, Perlin DS. Rapid, high-throughput, multiplex, real-time PCR for identification of mutations in the *cyp51A* gene of *Aspergillus fumigatus* that confer resistance to itraconazole. J Clin Microbiol 2005; 43(1): 214-222.
85. Garcia-Effron G, Dilger A, Cazar-Fuoli L, Park S, Mellado E, Perlin DS. Rapid detection of triazole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 2008; 46(4): 1200-1206.

86. Chryssanthou E. *In vitro* susceptibility of respiratory isolates of *Aspergillus* species to itraconazole and amphotericin B acquired resistance to itraconazole. Scand J Infect Dis 1997; 29(5): 509-512.
87. Verweij PE, Mensink M, Rijs AJ, Donnelly JP, Meis JF, Denning DW. *In-vitro* activities of amphotericin B, itraconazole and voriconazole against 150 clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. J Antimicrob Chemother 1998; 42(3): 389-392.
88. Dannaoui E, Persat F, Monier MF, Borel E, Piens MA, Picot S. *In-vitro* susceptibility of *Aspergillus* spp. isolates to amphotericin B and itraconazole. J Antimicrob Chemother 1999; 44(4): 553-555.
89. Verweij PE, Te Dorsthorst DT, Rijs AJ, De Vries-Hospers HG, Meis JF. Nationwide survey of *in vitro* activities of itraconazole and voriconazole against clinical *Aspergillus fumigatus* isolates cultured between 1945 and 1998. J Clin Microbiol 2002; 40(7): 2648-2650.
90. Mosquera J, Denning DW. Azole cross resistance in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(2): 556-557.
91. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. *In vitro* susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods. J Clin Microbiol 2005; 43(8): 3807-3810.
92. Hsueh PR, Lau YJ, Chuang YC, Wan JH, Huang WH, Shyr MJ, 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(2): 512-517.
93. Guinea J, Recio S, Pelaez T, Torres-Narbona M, Bouza E. Clinical isolates of *Aspergillus* species remain fully susceptible to voriconazole in the post-voriconazole era. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(9): 3444-3446.
94. Rodriguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, Cuenca-Estrella M. Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 2468-2472.
95. Espinel-Ingroff A, Johnson E, Hockey H, Troke P. Activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B *in vitro* against 590 moulds from 323 patients in the voriconazole Phase III clinical studies. J Antimicrob Chemother 2008; 61(3): 616-620.
96. Pfaller MA, Diekema DJ, Ghannoum MA, Rex JH, Alexander BD, Andes D, et al. Wild-type MIC distribution and epidemiological cutoff values for *Aspergillus fumigatus* and three triazoles as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. J Clin Microbiol 2009; 47(10): 3142-3146.
97. Baddley JW, Marr KA, Andes DR, Walsh TJ, Kauffman CA, Kontoyiannis DP, et al. Patterns of susceptibility of *Aspergillus* isolates recovered from patients enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. J Clin Microbiol 2009; 47(10): 3271-3275.
98. Amorim A, Guedes-Vaz L, Araujo R. Susceptibility to five antifungals of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from chronically

colonised cystic fibrosis patients receiving azole therapy. Int J Antimicrob Agents 2010; 35(4): 396-399.

99. Bueid A, Howard SJ, Moore CB, Richardson MD, Harrison E, Bowyer P, et al. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigates*: 2008 and 2009. J Antimicrob Chemother 2010; 65(10): 2116-2118.

100. Chowdhary A, Kathuria S, Jianping Xu, Cheshta S, Gandhi S, Pradeep KS, 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(12): E52871.

101. Lockhart SR, Frade JP, Etienne KA, Pfaller MA, Diekema DJ, Balajee SA. 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(9): 4465-4468.