DOI:10.16016/j.1000-5404.202001156

体外诱导耐药阿萨希毛孢子菌氟康唑耐药相关基因筛选

夏志宽[1,2],国 晶[2],张德全[3],鲁 勇[4],敖俊红[2],杨蓉娅[2] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)研究生院[1];100700 北京,解放军总医院第七医学中心全军皮肤损伤修复研究所[2];100120 北京,军委政治工作部原机关门诊部[3];150001 哈尔滨,93199 部队门诊部[4]

[**摘要**] **目的** 筛选阿萨希毛孢子菌氟康唑耐药相关基因,为研究该菌氟康唑耐药机制及开发新型抗真菌剂提供理论依据。**方法** 将临床分离的氟康唑敏感阿萨希毛孢子菌通过不断倍增氟康唑药物浓度的方法进行体外诱导培养,直至药物浓度≥128 μg/mL,再进行无药培养 30 代,测定其 MIC 值。分别提取敏感菌株和诱导耐药菌株的总 RNA,构建 RNA 文库,转录组测序后进行生物信息学分析,寻找差异表达基因。相同方法诱导另外 2 株敏感菌株为耐药菌株,并对 3 对敏感与耐药菌株的基因组进行测序,比较 ERG11 基因序列。**结果** 成功获得稳定的诱导耐药菌株,转录组发现耐药菌株中与药物转运相关基因、麦角固醇合成相关基因、抗氧化基因等上调表达,其中氟康唑靶酶编码基因 ERG11 基因表达上调了 3.7 倍。而基因组测序证实 3 株耐药菌株中 ERG11 基因的碱基序列未发生突变。**结论** 阿萨希毛孢子菌耐药分子机制复杂,麦角固醇合成途径中的基因,特别是 ERG11 基因上调表达是其主要机制之一,同时还与外排转运基因、抗氧化基因等有关。

[**关键词**] 阿萨希毛孢子菌;氟康唑;体外诱导;转录组;耐药基因;ERG11

[**中图法分类号**] R379.9; R394-33; R915 [**文献标志码**] A

Screening of fluconazole resistance-related genes in *Trichosporon asahii* with induced fluconazole resistance *in vitro*

XIA Zhikuan[1,2], GUO Jing[2], ZHANG Dequan[3], LU Yong[4], AO Junhong[2], YANG Rongya[2] [1]Graduate School, Army Medical University (Third Military Medical University) Chongqing, 400038; [2]PLA Institute of skin Damage and Repair, The Seventh Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100700; [3]Clinic of Former Organization of Political Work Department of the Military Commission, Beijing, 100120; [4]Clinic of 93199 Troop of PLA, Harbin, Heilongjiang Province, 150001, China

[**Abstract**] **Objective** To screen the genes associated with fluconazole resistance in *Trichosporon asahii* to facilitate mechanistic studies of fluconazole resistance and the development of new antifungal agents. **Methods** Three clinical isolates of fluconazole-sensitive *Trichosporon asahii* were cultured in the presence of increasing concentrations of fluconazole until the drug concentration reached 128 μg/mL. After further culture for 30 generations in the absence of fluconazole, the MIC value of the induced bacteria was measured. The total RNA was extracted from both the sensitive and resistant strains of the bacteria for construction of the stranded RNA-Seq libraries and transcriptome sequencing to identify the differentially expressed genes (DEGs) in the resistant strains. The genomes of the 3 sensitive and resistant strains were sequenced for comparison of the sequence of the differentially expressed ERG11 gene. **Results** We successfully obtained

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81271764,81571972);北京市自然科学基金面上项目(7202201)

[**通信作者**] 杨蓉娅,E-mail: sumyry@163.com

stable *Trichosporon asahii* strains with fluconazole resistance. Transcriptome sequencing data showed that the genes associated with drug transport, ergosterol synthesis and antioxidation were up-regulated in the resistant strains, and among them ERG11 gene, the target gene of fluconazole, was up-regulated by 3.7 folds. Genomic sequencing proved no mutations in the sequence of ERG11 gene in the 3 resistant strains. **Conclusion** The molecular mechanism for drug resistance in *Trichosporon asahii* is complex. The upregulation of ergosterol synthesis pathway, especially ERG11 gene, along with other genes associated with efflux transfer and oxidative stress, is one of the main mechanisms for drug resistance in *Trichosporon asahii*.

[**Key words**] *Trichosporon asahii*; fluconazole; induction *in vitro*; transcriptome; drug resistance gene; ERG11

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271764, 81571972) and the General Program of Natural Science Foundation of Beijing (7202201). Corresponding author: YANG Rongya, E-mail: sumyry@163.com

播散性毛孢子菌病是一种可累及包括皮肤、泌尿道、肺、肝脏、脾脏、中枢神经系统、心脏等器官的复杂真菌感染[1]。如诊治不及时,其病死率非常高,特别是中性粒细胞减少的癌症患者、接受侵袭性治疗以及广谱抗生素治疗的危重患者,病死率为30%~80%不等[2-3]。而阿萨希毛孢子菌(*Trichosporon asahii*, *T. asahii*)是引起播散性毛孢子菌病的最主要致病菌,近年来该菌的感染也呈明显上升的趋势。DE等[2]回顾分析了1994~2015年间537例侵袭性毛孢子菌感染的报道,其中由*T. asahii*引起的感染数量从1994~2004年间的25.8%,迅速增长到2005~2015年间的74.2%。GUO等[4]对2009~2016年间中国多个中心收集并经DNA准确鉴定的133株毛孢子菌分析发现,其中81.2%(108株)是*T. asahii*感染。以氟康唑为代表的三唑类抗真菌药物是临床上治疗毛孢子菌感染的最常用药物,而且对大部分*T. asahii*感染有效,但近年来,有关该菌对氟康唑等三唑类耐药的报道不断增多[2-4]。考虑到现有的对*T. asahii*具有抗真菌活性的药物数量有限,对三唑类药物耐药的发展可能严重影响侵袭性感染患者的病死率。但目前该菌对唑类药物耐药的机制不清,因此,开展唑类药物耐药机制研究,对寻找新的药物作用靶点、开发新型抗真菌药、降低患者病死率均有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

从我中心保存的*T. asahii*临床分离株中挑取了3株,编号分别为JM4、JM5、JM6,其中JM4分离至国内首例播散性毛孢子菌病患者面部皮肤,JM5和JM6分别分离至皮肤感染和泌尿系感染者的皮肤和尿液。

1.2 药物试剂和仪器

药物:氟康唑干粉购于美国Sigma公司。试剂:RPMI-1640干粉、二甲基亚砜(DMSO)、3-N-吗啉基丙磺酸干粉购于美国Sigma公司;酵母提取物购于英国Oxoid公司;PBS磷酸盐缓冲液干粉购于美国Hyclone公司;Trizol RNA提取试剂盒购于美国Invitrogen公司;真菌DNA提取试剂盒购于美国Omega公司;DNaseI购于美国Thermo公司;KAPA链RNA-Seq试剂盒、KAPA DNA样品制备试剂盒购于美国Kapa公司。仪器:HiSeq 3000第二代基因测序仪,美国Illumina公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株复苏与药敏实验 从-80 ℃冰箱中取出实验用菌株,融化后挑取少量菌落接种至马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上培养48 h,再取单菌落转种培养48 h。制备菌悬液并进行菌落计数,参照CLSI指南中推荐的M27-A3标准化方案[5]对3株菌株进行氟康唑药敏实验,测定其MIC值。

1.3.2 氟康唑体外诱导 参照*T. asahii*氟康唑体外诱导方法[6],对3株菌进行体外诱导耐药培养。氟康唑浓度从0.25 μg/mL开始,依次倍增,直至氟康唑浓度≥128 μg/mL,再无药传代30次,传代结束后进行氟康唑药敏实验,测定其MIC值。

1.3.3 RNA提取与转录组测序 将敏感菌株JM4及其体外诱导培养获得的耐药菌株(JM9)的单菌落分别接种于PDA固体培养基中,37 ℃培养48 h。用Trizol RNA提取试剂盒分别提取2株菌的总RNA,然后用DNase I去除潜在的基因组DNA污染。在定量和质量控制后,用KAPA链RNA-Seq试剂盒,从这些RNA样品中构建RNA-Seq文库。以上过程的具体步骤均参照试剂盒说明书进行。然后遵循标准Illumina

样品制备方案并使用 HiSeq 3000 二代基因测序仪进行高通量测序。

1.3.4　DNA 提取与基因组测序　　将敏感菌株 JM4、JM5、JM6 及其体外诱导耐药菌株 JM9、JM10、JM11 的单菌落分别接种于 PDA 固体培养基中,37 ℃培养至 48 h。参照试剂盒使用说明书,用真菌 DNA 提取试剂盒分别提取 6 株菌的 DNA,定量化后用 KAPA DNA 样品制备试剂盒,构建双末端的 DNA 文库。然后遵循标准 Illumina 样品制备方案并使用 HiSeq 3000 二代基因测序仪进行高通量测序。

1.3.5　生物信息学分析　　对 *T. asahii* 转录组进行高通量测序后,首先去除了低质量的序列和接头序列,然后使用 TopHat 软件(版本号 v2)将转录组测序读段与 *T. asahii* 标准株(CBS 2479)基因组进行比对。通过公式 FPKM(每百万测序读段中每 Kb 碱基长度上比对上的测序读段的数目)评估基因的表达水平。通过 R 语言包中 edgeR 包计算差异表达的基因(DEG)。标准如下:如果某基因的 FDR 值<0.001 且倍数变化>1.3(上调)或<0.7(下调),则认为这些基因是差异表达基因。使用 ABySS 软件拼接敏感菌株与耐药菌株的基因组序列,通过 BLASTN 软件鉴定出 ERG11 的基因序列。

2　结果

2.1　药敏与氟康唑体外诱导

诱导前 3 株菌 JM4、JM5、JM6 的氟康唑 MIC 值分别为 2 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL,氟康唑体外诱导后及无药传代 30 代后其 MIC 值均≥64 μg/mL,意味着将 3 株氟康唑敏感菌株诱导成为稳定的氟康唑耐药菌株,并分别命名为 JM9、JM10、JM11(表 1)。

表 1　实验菌株诱导前后对氟康唑药物敏感性的变化

菌株编号	来源	诱导前 MIC 值	诱导后 MIC 值	传代后 MIC 值(编号)
JM4	皮肤	2 μg/mL	≥128 μg/mL	≥64 μg/mL(JM9)
JM5	皮肤	1 μg/mL	≥128 μg/mL	≥64 μg/mL(JM10)
JM6	尿液	2 μg/mL	≥64 μg/mL	≥64 μg/mL(JM11)

2.2　RNA 提取与转录组测序质量

成功提取了敏感菌株 JM4 及其诱导耐药菌株 JM9 的总 RNA,均未发生降解,可用于建立文库及高通量测序。对转录组测序进行 2 个生物学重复,表 2 是转录组测序数据统计表,总共获得 4Gb 高质量数据量,两株菌的转录组测序数据饱和图如图 1 所示,表明测序数据量可以满足后续对表达量差异变化基因的筛选。

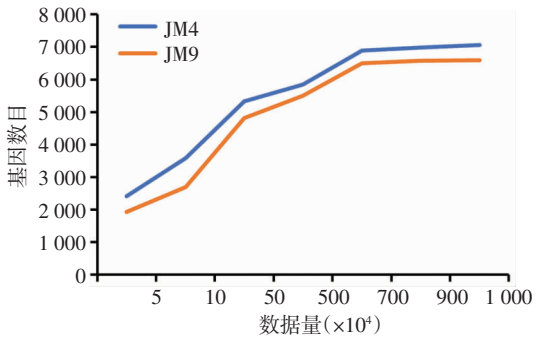


图 1　转录组数据饱和图　(JM4 为敏感菌株,JM9 为耐药菌株)

2.3　差异表达基因筛选

根据相关生物信息学软件分析、比对,计算得到表达量信息和差异表达情况,其中,1 405 个基因表达上调,2 112 个基因表达下调。初步确定了 73 个和耐药相关的基因,其中 38 个为上调表达的基因。主要包括麦角固醇生物合成途径上的相关基因,如 ERG11、ERG3 等,其中氟康唑药物作用靶酶基因 ERG11 在耐药菌株中的表达量是敏感菌株的 3.7 倍(表 3);药物外排转运有关的基因,如 ATP 结合盒(ABC)、主要易化子超家族(MFS)转运蛋白基因等(表 4);以及抗氧化基因等,如硫氧还蛋白过氧化物酶(TPx)基因在耐药菌株中的表达量是敏感菌株的 40 倍。

2.4　ERG11 全基因序列比较

为了明确 DNA 水平突变特别是 ERG11 基因是否与氟康唑耐药相关,对 3 株敏感菌株及其耐药菌株分别进行基因组测序,数据量均约 3G,覆盖在 100X 以上,数据量足以满足后续基因组拼接和突变检测分析。通过拼接和比对分析,确定了 6 株菌 ERG11 基因的全基因序列,发现 6 株菌的 ERG11 基因在 DNA 水平上序列没有发生突变,3 株敏感菌株与 3 株诱导耐药菌株的 ERG11 基因序列完全一致。

表 2　转录组测序统计数据

样本	原始序列数	原始数据量/bp	高质量序列数	高质量数据量/bp
敏感株重复 1	12633260	1212792960	12095840	1037129254
敏感株重复 2	12633260	1212792960	12095840	931176844
耐药株重复 1	10726491	1029743136	10332991	952714950
耐药株重复 2	10726491	1029743136	10332991	867364305

表 3 麦角固醇合成途径中相关基因的表达量变化

基因编号	耐药均值	敏感均值	差异倍数	注释	基因
A1Q1_00523	650.032	55.945 1	11.6	C-8 sterol isomerase	ERG2
A1Q1_00651	2 158.87	1 071.2	2.0	C-4 methyl sterol oxidase	ERG25
A1Q1_00690	430.775	505.762	−1.2	C-22 sterol desaturase	ERG5
A1Q1_00880	199.086	78.789	2.5	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase	ERG9
A1Q1_01564	50.593	56.022 7	−1.1	hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH)	HMG
A1Q1_01672	1 670.04	778.04	2.1	squalene monooxygenase	ERG1
A1Q1_01819	292.278	64.035 3	4.6	C-3 sterol dehydrogenase (C-4 sterol decarboxylase)	ERG26
A1Q1_02098	1 217.17	329.852	3.7	lanosterol 14-alpha-demethylase	ERG11
A1Q1_03320	319.9	145.559	2.2	C-5 sterol desaturase	ERG3
A1Q1_05989	1 008.21	171.551	5.9	acetyl-CoA C-acetyltransferase	ERG10
A1Q1_06312	193.116	95.859 2	2.0	C-14 sterol reductase	ERG24
A1Q1_06727	1 067.68	182.765	5.8	sterol 24-C-methyltransferase	ERG6
A1Q1_07715	357.714	58.171 1	6.1	diphosphomevalonate decarboxylase	ERG19
A1Q1_07921	114.98	62.960 3	1.8	lanosterol synthase	ERG7

表 4 药物外排转运相关基因的表达量变化

基因编号	耐药/敏感	注释
A1Q1_07193	2.9	Homolog of MFS transporter. Multidrug resistance efflux pump.
A1Q1_07942	8.8	ABC protein
A1Q1_04656	1.2	efflux proteinEncT
A1Q1_07398	45.1	Homolog of MFS transporter transporter, tetracycline efflux pump.
A1Q1_08012	2.3	Homolog of MFS transporter transporter. Multidrug resistance efflux pump.
A1Q1_08156	19.3	Homolog of MFS transportertransporter, tetracycline efflux pump.
A1Q1_08276	42.0	Homolog of MFS transporter, ACS family, pantothenate transporter or FEN2
A1Q1_00730	38.0	aflatoxin efflux pump AFLT
A1Q1_04359	11.2	MFS alpha-glucoside transporter
A1Q1_06164	1.8	xenobiotic-transporting ATPase
A1Q1_01754	2.2	ER togolgi family transport-related protein
A1Q1_00017	10.0	phosphatidylinositol transporter
A1Q1_00031	3.2	amino acid transporter
A1Q1_00867	9.6	metal ion transporter
A1Q1_01225	2.1	flavin-adenine dinucleotide transporter
A1Q1_01481	1.9	inner membrane citrate transporter Ctp1p
A1Q1_01626	5.8	phospholipid transporter
A1Q1_02511	2.8	transporter
A1Q1_04142	1.4	organic acid transporter
A1Q1_04426	3.2	electron transporter transferring electrons within CoQH2-cytochrome creductase complex
A1Q1_05965	3.0	dicarboxylic acid transporter
A1Q1_06363	2.2	S-adenosylmethionine transporter
A1Q1_02271	1.8	hexose transport-related protein
A1Q1_03522	2.3	electron transporter
A1Q1_04374	15.4	inorganic phosphate transporter
A1Q1_06083	38.0	ammonium transporter

3 讨论

不同于白念珠菌等真菌,目前有关 *T. asahii* 唑类药物耐药的分子机制研究较少,而大量的研究报道表明氟康唑(FLC)等三唑类药物的临床耐药现象及严重后果正日益凸显。BASU 等[7]在 3 例败血症患者体内分离出两性霉素 B(AMB)和 FLC 双重耐药的 *T. asahii* 分离株,这对患者来说是致命的。VASHISHTHA 等[8]在 8 例新生儿败血症患者中均分离到了 FLC 耐药的 *T. asahii*,其中 6 例在接受抗真菌治疗后死亡。根据流行病学界值(ECV),FLC 的 ECV 值为 8 μg/mL,*T. asahii* 的 MIC 大于该值即定义为非野生型菌株,表

示已经出现了耐药[3]。PADOVAN 等[9]据此回顾分析了 19 项有关 *T. asahii* 对三唑类药物敏感性的研究,其中 15 项均至少发现了 1 株 FLC 耐药的 *T. asahii*。根据 GUO 等[4]的研究数据分析,中国临床分离的 *T. asahii* 菌株有 25%为 FLC 耐药菌株。而我们[10]也在国内首例播散性毛孢子菌病患者治疗 15 年后的面部皮损中分离到 FLC 耐药的 *T. asahii*。而通过体外诱导获得单药耐药菌株是真菌耐药机制研究的常用方法,可与体内耐药菌研究互补。本研究中通过体外诱导获得的 3 株菌的 MIC 值均≥64 μg/mL,是理想的体外诱导耐药的研究模型。

麦角固醇是真菌细胞膜发挥多种细胞功能所不可或缺的成分,是由其前体物质羊毛固醇在 14-α-脱甲基酶等一系列酶的催化下合成的。而氟康唑等唑类药物以羊毛固醇 14-α-脱甲基酶为作用靶酶,通过抑制该酶的催化活性,阻碍麦角固醇的合成而达到抗真菌的作用。ERG11 基因是羊毛固醇 14-α-脱甲基酶的编码基因,该基因的突变以及上调表达均与唑类耐药有关[11]。GOŁABEK 等[12]对 120 株白念珠菌的 ERG11 基因的表达变化进行了研究,发现 60 株耐药菌株的平均表达量显著高于 60 株敏感菌株的平均表达量。我们的研究也发现 ERG11 基因在耐药菌株中的表达量是敏感菌株的 3.7 倍,表明在 *T. asahii* 中 ERG11 基因的上调表达与 FLC 耐药机制相关。而 ERG11 基因的表达上调可能与其调控基因的突变有关,其中最主要的是编码锌簇转录调节因子的 Upc2p 基因。但我们在其上游启动子区序列中未发现 Upc2p 的同源基因。我们因此推测,ERG11 基因的上调表达可能是 *T. asahii* 对氟康唑的一种应激反应,而非由基因表达调控改变所致。

除了表达量的变化,ERG11 基因突变也是唑类耐药的主要原因之一。对白念珠菌 ERG11 基因的突变研究发现,ERG11 基因突变大多数位于三个热点区域中,这些编码区域的突变,可以导致氨基酸的取代,进而使 14-α-脱甲基酶活性区域的三维结构发生改变,导致唑类药物与酶的结合下降,引起耐药[13]。我们在体外诱导的 3 株 FLC 耐药菌株中均未发现 ERG11 基因突变,这与笔者之前在体内分离到的 *T. asahii* 氟康唑耐药菌株中发现多个突变位点的结果并不一致[10]。KUSHIMA 等[14]从菌血症患者体内分离到 6 株对唑类(氟康唑、咪康唑、伊曲康唑、伏立康唑)具有交叉耐药的临床菌株,发现 ERG11 基因在所有分离株中均存在点突变(G448A),这一突变导致了甘氨酸替代,而这与他们之前在体外诱导耐药菌株中发现的一个突变位点并不同。他们认为,持续的唑类暴露诱导突变,从而产生对这类抗真菌药物的耐药。此外,在另外一项针对 *T. asahii* 临床标准株和环境株的氟康唑体外诱导耐药研究中也未在临床株中发现 ERG11 基因的突变,仅在环境株中发现了一个突变位点[15]。而在白念珠菌等其他真菌中也发现了仅有 ERG11 基因的表达上调,而无 ERG11 基因突变的情况[16]。因此,我们认为这种体内与体外、临床与环境、菌株与菌株之间的突变差异性,也正说明了真菌耐药机制的复杂性以及我们目前对耐药机制研究所知的局限性。

唑类耐药性的产生除了与 ERG11 基因改变有关外,通常还与药物外排泵的激活以及抗氧化应激等有关。目前已知的外排泵蛋白家族基因主要包括两大类:ATP 结合盒(ABC)转运蛋白基因和主要易化子超家族(MFS)转运蛋白基因。我们的研究也同样发现了在 FLC 耐药的 *T. asahii* 菌株中 ABC、MFS 等外排泵基因的表达上调,而且与念珠菌的 FLC 耐药菌株中外排泵基因的高表达有着极高的相似性[17]。此外,除了外排泵基因,抗氧化基因也参与了耐药机制的形成,表现为硫氧还蛋白过氧化物酶(TPx)基因表达上调了 40 倍。另一研究也发现氧化还原过程和跨膜运输相关的基因在 *T. asahii* 的 FLC 暴露时发生了变化[15]。JIA 等[18]研究发现氟康唑可以诱导对唑类和两性霉素 B 交叉耐药的热带念珠菌产生活性氧(ROS)。而 ROS 的产生超过抗氧化酶系统的清除能力时,可引起蛋白质、脂类等生物大分子的损伤,白念珠菌等通过表达超氧化物歧化酶和过氧化氢酶,以及谷氨酰胺多辛和硫氧还蛋白等来降低 ROS 的损伤,导致药物的敏感性下降。我们研究发现的 TPx 是细胞内重要的氧化还原调节分子之一,可以帮助真菌细胞清除 ROS,从而减少 ROS 的聚积,降低细胞的损伤。这也说明抵抗氧化应激的抗氧化反应可能也是引起 *T. asahii* 耐药的机制之一,这对于未来寻找新的抗真菌靶点及新药开发研究都有着重要的意义和启发。但真菌通过抗氧化应激的防御反应来产生对唑类药物耐药的机制并不完全明确,目前仍有争议,如 MARTINS 等[19]发现过氧化氢酶活性的抑制反而增加了啤酒酵母对唑类药物的耐药性,而不是我们所理解的当抗氧化防御被削弱时,真菌的耐药性降低。

总之,我们的研究虽然表明 ERG11 基因、外排转运相关基因及抗氧化基因等表达上调均可能与 *T. asahii* 氟康唑耐药机制有关,但对于其耐药机制我们了解的仍太少,特别是对于抗氧化机制的研究。

参考文献:

[1] MILAN E P, SILVA-ROCHA W P, DE ALMEIDA J J S,

et al. *Trichosporon inkin* meningitis in Northeast Brazil: first case report and review of the literature[J]. BMC Infect Dis, 2018, 18(1): 470. DOI: 10.1186/s12879-018-3363-7.

[2] DE ALMEIDA JÚNIOR J N, HENNEQUIN C. Invasive Trichosporon infection: a systematic review on a Re-emerging fungal pathogen[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1629. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01629.

[3] FRANCISCO E C, DE ALMEIDA JUNIOR J N, DE QUEIROZ TELLES F, *et al*. Species distribution and antifungal susceptibility of 358 Trichosporon clinical isolates collected in 24 medical centres[J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(7): 909.e1-909909.e5. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.03.026.

[4] GUO L N, YU S Y, HSUEH P R, *et al*. Invasive infections due to Trichosporon: species distribution, genotyping, and antifungal susceptibilities from a multicenter study in China [J]. J Clin Microbiol, 2019, 57(2): e01505-e01518. DOI: 10.1128/JCM.01505-18.

[5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts[M]. Nattional Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA; 2002.

[6] KUSHIMA H, TOKIMATSU I, ISHII H, *et al*. Cloning of thelanosterol 14-α-demethylase (ERG11) gene in *Trichosporon asahii*: a possible association between G453R amino acid substitution and azole resistance in *T. asahii*[J]. FEMS Yeast Res, 2012, 12(6): 662-667. DOI:10.1111/j.1567-1364.2012.00816.x.

[7] BASU S, TILAK R, KUMAR A. Multidrug-resistant Trichosporon: an unusual fungal Sepsis in preterm neonates[J]. Pathog Glob Health, 2015, 109(4): 202-206. DOI:10.1179/2047773215Y.0000000019.

[8] VASHISHTHA V M, MITTAL A, GARG A. A fatal outbreak of *Trichosporon asahii* sepsis in a neonatal intensive care unit [J]. Indian Pediatr, 2012, 49(9): 745-747. DOI:10.1007/s13312-012-0137-y.

[9] PADOVAN A C B, ROCHA W P D S, TOTI A C M, *et al*. Exploring the resistance mechanisms in *Trichosporon asahii*: Triazoles as the last defense for invasive trichosporonosis[J]. Fungal Genet Biol, 2019, 133: 103267. DOI:10.1016/j.fgb.2019.103267.

[10] XIA Z K, YU H Y, WANG C M, *et al*. Genomic andtranscriptome identification of fluconazole-resistant genes for *Trichosporon asahii*[J]. Med Mycol, 2020, 58(3): 393-400. DOI: 10.1093/mmy/myz088.

[11] FLOWERS S A, COLÓN B, WHALEY S G, *et al*. Contribution of clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in *Candida albicans*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(1): 450-460. DOI: 10.1128/AAC.03470-14.

[12] GOŁABEK K, STRZELCZYK J K, OWCZAREK A, *et al*. Selected mechanisms of molecular resistance of *Candida albicans* to azole drugs[J]. Acta Biochim Pol, 2015, 62(2): 247-251. DOI:10.18388/abp.2014_940.

[13] FENG L J, WAN Z, WANG X H, *et al*. Relationship between antifungal resistance of fluconazole resistant *Candida albicans* and mutations in ERG11 gene[J]. Chin Med J, 2010, 123(5): 544-548.

[14] KUSHIMA H, TOKIMATSU I, ISHII H, *et al*. A new amino acid substitution at G150S inlanosterol 14-α demethylase (Erg11 protein) in multi-azole-resistant *Trichosporon asahii* [J]. Med Mycol J, 2017, 58(1): E23-E28. DOI: 10.3314/mmj.16-00027.

[15] LI H T, WANG C M, CHEN Y, *et al*. Integratedtranscriptomic analysis of *Trichosporon Asahii* uncovers the core genes and pathways of fluconazole resistance[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17847. DOI: 10.1038/s41598-017-18072-9.

[16] ALIZADEH F, KHODAVANDI A, ZALAKIAN S. Quantitation ofergosterol content and gene expression profile of ERG11 gene in fluconazole-resistant *Candida albicans*[J]. Curr Med Mycol, 2017, 3(1): 13-19. DOI: 10.29252/cmm.3.1.13.

[17] SOUZA A C, FUCHS B B, PINHATI H M, *et al*. *Candida parapsilosis* resistance to fluconazole: molecular mechanisms and in vivo impact in infected Galleria mellonella larvae[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(10): 6581-6587. DOI: 10.1128/AAC.01177-15.

[18] JIA C, ZHANG J, ZHUGE Y Z, *et al*. Synergistic effects of geldanamycin with fluconazole are associated with reactive oxygen species in *Candida tropicalis* resistant to azoles and amphotericin B[J]. Free Radic Res, 2019, 53(6): 618-628. DOI: 10.1080/10715762.2019.1610563.

[19] MARTINS D, NGUYEN D, ENGLISH A M. Ctt1 catalase activity potentiates antifungal azoles in the emerging opportunistic pathogen *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 9185. DOI: 10.1038/s41598-019-45070-w.

(**收稿**:2020-01-17;**修回**:2020-03-05)

(编辑 邓强庭)