ภาวะการดื้อยาต้านเชื้อรา: ประเด็นในทางปฏิบัติและกลยุทธ์ใหม่ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ (antifungal drug resistance: practical point and innovative strategy for detection in laboratory aspect)

กรวลี มีศิลปวิกกัย
อาสา ธรรมหงส์

บทนำ

ในปัจจุบันการติดเชื้อราทางการแพทย์มีอัตราการติดเชื้อสูงขึ้นตามลำดับ โดยเฉพาะในผู้ป่วยมะเร็งทางโลหิตวิทยา ผู้ป่วยเอดส์ ผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายอวัยวะที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ได้รับยาเคมีบำบัด หรือรังสีรักษา รวมทั้งผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันผิดปกติจากภาวะแทรกซ้อนของโรคหรือผลข้างเคียงจากยารักษาโรค[1] เช่น ผู้ป่วยโรคเบาหวานที่ไม่สามารถคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันขนาดสูงเป็นเวลานาน[2] หรือผู้ป่วยติดเชื้อโควิด-2019 ชนิดลุกลามในปอด[3] เป็นต้น ข้อมูลทางสถิติจากประเทศญี่ปุ่น[4, 5] อินเดีย[6, 7] ออสเตรเลีย[8, 9] และประเทศไทย[10-17] พบว่า อัตราการติดเชื้อราฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ทวีจำนวนมากขึ้นตามลำดับ อีกทั้งอัตราการเสียชีวิตก็เพิ่มจำนวนมากขึ้นในแต่ละปี ก่อให้เกิดความเสียหายทั้งทางด้านเศรษฐกิจและสังคม โดยมีกลุ่มเชื้อราก่อโรคที่สำคัญได้แก่ *Candida* species, *Cryptococcus* species และ *Aspergillus* species[18]

ในขณะที่อุบัติการณ์การติดเชื้อราเพิ่มจำนวนมากขึ้น ยาต้านเชื้อรายังคงมีใช้อย่างจำกัด[19] อาทิเช่น ยาในกลุ่ม polyenes, azoles, echinocandins เป็นต้น ยาต้านเชื้อราเหล่านี้มีข้อจำกัดในการใช้ เนื่องจากผลข้างเคียงจากยา หรือมีปฏิกิริยากับยาอื่น ๆ[19] ประกอบกับอัตราการพบเชื้อดื้อยามีจำนวนเพิ่มขึ้นทุกปี[20] ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากมีการใช้ยาต้านเชื้อราเพื่อป้องกันการติดเชื้อรามากขึ้นในปัจจุบัน รวมถึงการใช้ยาต้านเชื้อราในกสิกรรม ทำให้มีโอกาสที่เชื้อจะดื้อยามากขึ้น[21] ดังนั้นองค์ความรู้เกี่ยวกับกลไกการดื้อยาของเชื้อรา และการตรวจหาความไวรับของเชื้อรา (antifungal susceptibility test) ที่มีการพัฒนาทางด้านเทคนิคเชิงโมเลกุลจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อราในปัจจุบัน

กลไกการดื้อยาต้านเชื้อรา (mechanism of antifungal resistance)

ภาวะดื้อยาต้านเชื้อราเป็นภาวะที่เชื้อราสามารถเจริญได้ในความเข้มข้นของยาต้านเชื้อราที่เชื้อราส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ ภาวะดื้อยาแบ่งได้เป็นสองรูปแบบ กล่าวคือ intrinsic resistance และ acquired resistance โดย intrinsic resistance คือภาวะดื้อยาต้านเชื้อราในกลุ่มของเชื้อราที่มีคุณสมบัติในการกำจัดยาต้านเชื้อราบางชนิดด้วยการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบที่เป็นเป้าหมายของยาต้านเชื้อรา หรือเชื้อราบางชนิดมีคุณสมบัติในการกำจัดยาต้านเชื้อราผ่านการขนส่งออกจากเซลล์ (efflux pump) อาทิเช่น *Aspergillus* species, *Candida krusei, Candida auris* มีภาวะ intrinsic resistance ต่อ fluconazole หรือ เชื้อราในกลุ่ม Mucoromycota มีภาวะ intrinsic resistance ต่อ azoles เป็นต้น[22]

สำหรับ acquired resistance นั้นเป็นภาวะที่เชื้อราสามารถเจริญได้แม้ในภาวะที่มียาต้านเชื้อราความเข้มข้นสูง โดยที่เชื้อราในสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type strains) ไม่สามารถเจริญได้ สำหรับเชื้อราบางกลุ่มที่สามารถเจริญได้ แต่ช้ากว่าปกติ ในสภาวะที่มียาต้านเชื้อราในระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมได้ (minimal inhibitory concentrations, MICs) เป็นกลุ่มภาวะที่เรียกว่า antifungal tolerance หรือ hetero-resistance[22]

สำหรับกลไกในการดื้อยาในยาต้านเชื้อราแต่ละชนิด สามารถแบ่งได้ตามชนิดของยาดังต่อไปนี้

1. ยาต้านเชื้อรากลุ่ม azole

กลุ่ม azole มีหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของ lanosterol C-14a demethylase (Cyp51p หรือ Erg11p) ในการสร้าง ergosterol บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา[23-25] กลไกในการดื้อยาในกลุ่มนี้[22] ได้แก่

ก. Efflux pump overexpression: เชื้อในกลุ่ม *Candida* จะมีการเพิ่ม efflux pump เพื่อขับยากลุ่ม azole ออกจากเซลล์

ข. Overexpression of drug target: เชื้อในกลุ่ม *Cryptococcus neoformans* จะมีเพิ่มจำนวนโครโมโซม และมีการกลายพันธุ์ของยีน (chromosome aneuploidy, hypermutation)

ค. Tandem repeat ที่บริเวณ promoter ของ drug target: เชื้อในกลุ่ม *Aspergillus fumigatus* มี tandem repeat (TR) ที่ promoter ของยีน *cyp51A* เช่น TR34/L98H ที่พบมากที่สุดและแพร่กระจายไปทั่วโลก[21] มีผลทำให้เกิดการดื้อยาต่อ itraconazole, voriconazole และบางครั้งอาจก่อให้เกิดการดื้อยาต่อ posaconazole[26, 27] นอกจากนั้นการกลายพันธุ์อื่น ๆ เช่น TR46/Y121F/T289A ก็จะยิ่งทำให้เชื้อดื้อต่อ voriconazole สูงขึ้น[28-30]

2. ยาต้านเชื้อรากลุ่ม polyenes

กลไกการทำงานของกลุ่ม polyene เช่น amphotericin B ในการทำลายเชื้อรานั้นคือการที่ตัวยาสามารถจับได้กับ ergosterol บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา และก่อให้เกิดช่องว่างที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ขาดสภาพสมดุล[31, 32] กลไกในการดื้อยาในกลุ่มนี้[22] ได้แก่

ก. การกลายพันธุ์ของยีนแบบ loss-of-function ของยีน *erg3* ก่อให้เกิดภาวะ resistance พบใน *C. albicans*

ข. การตอบสนองต่อภาวะความตึงเครียดต่อเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane stress) ส่งผลให้เกิดการเพิ่มการแสดงออกของ *erg5, erg6, erg25* รวมทั้งส่งผลต่อการทำงานของ HSP90 ซึ่งสัมพันธ์กับภาวะ drug tolerance

3. ยาต้านเชื้อรากลุ่ม echinocandins เช่น micafungin, anidulafungin เป็นต้น[22]

ก. การกลายพันธุ์ของยีน *fks1* ซึ่งเป็นยีนที่สำหรับสร้าง (1,3)-B-D-glucan synthase มักพบเป็นกลไกการดื้อยาใน *Candida* และ *Fusarium*

ข. Stress response pathway: HSP90/calcineurin/RAS/mTOR response ซึ่งส่งผลให้เกิดภาวะดื้อยา

4. ยาต้านเชื้อรากลุ่ม pyrimidine analogues เช่น flucytosine เป็นต้น[22]

ก. Point mutation ที่ยีน *fcy1* (*Candida*)

Update on CLSI and EUCAST and antifungal susceptibility tests

สำหรับ CLSI ล่าสุดในการแปลผลเชื้อในกลุ่ม *Candida* คือ CLSI M27M44S, 2022[33] สามารถสรุป clinical breakpoint สำหรับเชื้อ *Candida* ที่พบบ่อยได้ดังตารางที่ 1[33] โดยมีการเพิ่ม rezafungin และข้อมูล clinical breakpoint ของ *Candida auris* โดยกำหนดค่า susceptible สำหรับ rezafungin คือ $\leq$0.5 มก./มล.

สำหรับเชื้อราเส้นสายนั้น CLSI M38M51S, 2022[34] ได้มีการกำหนด clinical breakpoint ของเชื้อ *Aspergillus fumigatus sensu stricto* โดยกำหนดค่า susceptible, intermediate และ

resistant สำหรับยา voriconazole ไว้ดังนี้ ≤0.5; 1; ≥2 ตามลำดับ

สำหรับเชื้อบางกลุ่มและยาบางชนิดที่ไม่ครอบคลุมใน CLSI นั้น ได้มีการแนะนำให้จัดทำ epidemiological cut-off values (ECVs) โดยรวบรวมข้อมูล MIC จากเชื้อที่ไม่ดื้อยา[35]

ตารางที่ 1. การแปลผลความไวรับของเชื้อ *Candida* spp. ตาม CLSI M27M44S, 2022[33]

Antifungal agents	Clinical breakpoint (mg/mL)								
	C. albicans			*C. glabrata*			*C. tropicalis*		
	S	SDD/I*	R	S	SDD/I*	R	S	SDD/I*	R
Fluconazole	≤2	4	≥8	-	≤32	≥64	≤2	4	≥8
Voriconazole	≤0.12	0.25-0.5	≥1	-	-	-	≤0.12	0.25-0.5	≥1
Anidulafungin	≤0.25	0.5	≥1	≤0.12	0.25	≥0.5	≤0.25	0.5	≥1
Caspofungin	≤0.25	0.5	≥1	≤0.12	0.25	≥0.5	≤0.25	0.5	≥1
Micafungin	≤0.25	0.5	≥1	≤0.06	0.12	≥0.25	≤0.25	0.5	≥1
Rezafungin	≤0.25	-	-	≤0.5	-	-	≤0.25	-	-

MIC: minimal inhibitory concentration, S: susceptible, SDD: susceptible dose-dependent, I: intermediate, R: resistant, * SSD ใช้สำหรับ fluconazole เท่านั้น

สำหรับ EUCAST นั้น มีการเปลี่ยนแปลงตารางการแปลผลอย่างสม่ำเสมอ (EUCAST: http://www.eucast.org/ast_of_fungi/) ล่าสุดตารางแสดงความไวรับของเชื้อทั้งยีสต์และราเส้นสายเป็นฉบับที่ 10 ในปี ค.ศ. 2020 สามารถสรุปการแปลผลความไวรับของเชื้อราที่สำคัญได้ดังตารางที่ 2 และตารางที่ 3

ตารางที่ 2. การแปลผลความไวรับของเชื้อ *Candida* ตาม EUCAST version 10.0, 2020 (EUCAST: http://www.eucast.org/ast_of_fungi/)

Antifungal agents	Clinical breakpoint (mg/mL)								
	C. albicans			*C. glabrata*			*C. tropicalis*		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Fluconazole	≤2	4	>4	≤0.001	≤16	>16	≤2	4	>4
Isavuconazole	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND
Itraconazole	≤0.06	-	>0.06	ND	-	ND	≤0.125	-	>0.125
Voriconazole	≤0.06	0.125-0.25	>0.25	ND	-	ND	≤0.125	0.25	>0.25
Posaconazole	≤0.06	-	>0.06	ND	-	ND	≤0.06	-	>0.06
Anidulafungin	≤0.03	-	>0.03	≤0.06	-	>0.06	≤0.06	-	>0.06
Micafungin	≤0.016	-	>0.016	≤0.03	-	>0.03	ND	-	ND
Amphotericin B	£ 1	-	> 1	≤1	-	> 1	≤1	-	>1

ND: not determined, R: resistant, S: susceptible, I: intermediate

ตารางที่ 3. การแปลผลความไวรับของเชื้อ *Aspergillus* ตาม EUCAST version 10.0, 2020 (EUCAST: http://www.eucast.org/ast_of_fungi/)

Antifungal agents	Clinical breakpoint (mg/mL)					
	A. flavus		*A. fumigatus*		*A. terreus*	
	S	R	S	R	S	R
Isavuconazole	1	2	≤1	>2	≤1	>1
Itraconazole	≤1	>1	≤1	>1	≤1	>1
Voriconazole	ND	ND	≤1	>1	ND	ND
Posaconazole	ND	ND	≤0.125	>0.25	≤0.125	>0.25
Amphotericin B	-	-	≤1	>1	-	-

ND: not determined, R: resistant, S: susceptible, I: intermediate

สิ่งที่สำคัญที่ควรคำนึงถึงไม่ว่าจะยึดการแปลผลตาม CLSI หรือ EUCAST นอกจากวิธีการทดสอบทั้งสองจะแตกต่างกันแล้ว ค่าการแปลผลก็มีความแตกต่างกัน ดังนั้นหากใช้วิธีการทดสอบตามหลักการใด ควรต้องแปลผลค่าความไวรับตามหลักการนั้น ๆ และทุกครั้งควรมีการ

เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน (quality controls) ได้แก่ *C. parapsilosis* ATCC22019, *C. krusei* ATCC6258, *A. fumigatus* ATCC204305, *A. flavus* ATCC204304, *A. fumigatus* F6919, *A. flavus* CM1813 เป็นต้น[33, 34, 36]

Molecular detection of antifungal resistance

สำหรับการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่สามารถนำไปสู่การดื้อยาของเชื้อรานั้น อาจสามารถตรวจหาได้จากวิธีการทาง molecular ที่ใช้ในการทำนายภาวะดื้อยาที่จะเกิดขึ้น โดยสามารถแบ่งการตรวจหานั้นได้ 2 รูปแบบ[37] ดังนี้

1. Intrinsic microbiological resistance detection

ภาวะการดื้อยานี้เป็นคุณสมบัติของเชื้อราในแต่ละกลุ่มที่มีมาแต่แรกโดยที่ยังไม่เคยสัมผัสยาต้านเชื้อราที่ดื้อมาก่อน โดยที่ภาวะนี้เป็นภาวะที่พบบ่อยในกลุ่มเชื้อราจำเพาะ ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นที่จะต้องทดสอบความไวรับยาต้านเชื้อราที่ดื้อกับกลุ่มเชื้อราจำเพาะที่มีภาวะ intrinsic resistance ยกตัวอย่างเช่น *Candida krusei* (*Pichia kudriavzevii*) และ *Aspergillus fumigatus* มี intrinsic resistance ต่อยากลุ่ม fluconazole, Basidiomycetes และ Mucorales มี intrinsic resistance ต่อยากลุ่ม echinocandin

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราถึงระดับ species สามารถใช้ในการทำนายภาวะ intrinsic resistance ที่พบได้ในเชื้อราแต่ละชนิด โดยวิธีการจัดจำแนกเชื้อนั้นสามารถใช้วิธีการเชิงโมเลกุลได้ อาทิ เช่น matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) เป็นต้น[38] แต่อย่างไรก็ตามวิธี MALDI-TOF ขึ้นอยู่กับขั้นตอนการสกัดและฐานข้อมูล ดังนั้นเชื้อราเส้นสายที่สกัดโปรตีนได้ยากอาจทำให้การแปลผลคลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นวิธีการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราที่เป็นมาตรฐานยังคงเป็นวิธีการทางพันธุกรรม คือ DNA sequencing[39]

สำหรับการจัดจำแนกเชื้อราโดยใช้ลำดับเบสนั้น บริเวณยีนที่นิยมในการใช้จัดจำแนกคือ ribosomal DNA internal transcribed spacers regions (ITS)[40] ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกเชื้อในกลุ่ม *Candida* และ Mucorales ถึงระดับ species ได้อย่างแม่นยำ สำหรับเชื้อในกลุ่ม *Aspergillus* นั้นต้องใช้ ITS sequencing ร่วมกับ calmodulin sequencing (CaM)[41] สำหรับเชื้อในกลุ่ม *Fusarium* ต้องใช้ ITS sequencing ร่วมกับ RNA polymerase II (RPB2) และ translation elongation factor 1 alpha (TEF1)[42]

ในปัจจุบันมีการนำความรู้เชิงโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการโดยสามารถจัดจำแนกเชื้อได้จากผลเพาะเชื้อจากเลือด ซึ่งทำให้ได้ผลอย่างรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดคือสามารถจัดจำแนกเชื้อถึงระดับ species ได้ในบางสายพันธุ์ อาทิเช่น BioFire-FilmArray, *Candida* PNA FISH assay, T2*Candida,* SeptiFast เป็นต้น[43] โดย BioFire Filmarray สามารถจัดจำแนกเชื้อ

Candida albicans, C. parapsilosis sensu stricto, C. glabrata sensu stricto, C. tropicalis, C. krusei (intrinsic fluconazole resistance), *Cryptococcus neoformans/gattii* complex (intrinsic echinocandin resistance), *Candida auris* (multidrug resistance)[43] สำหรับเชื้อในกลุ่ม *Aspergillus* ได้มีการพัฒนาชุด real-time PCR เพื่อใช้ในการตรวจหาชนิดของ *Aspergillus* และการดื้อยา azole ในห้องปฏิบัติการ เช่น AsperGenius ซึ่งสามารถจัดจำแนกเชื้อในกลุ่ม *A. fumigatus, A. terreus* และ *Aspergillus* species ได้[44]

2. Secondary resistance detection

จากความรู้ด้านกลไกการดื้อยาของเชื้อรา การกลายพันธุ์ของยีน *ERG11* และ *CYP51A* มีความสัมพันธ์ในการทำนายการดื้อยาในกลุ่ม azole ของเชื้อ *Candida* และ *Aspergillus* ตามลำดับ รวมทั้งการกลายพันธ์ของยีน *fks* ส่งผลต่อการดื้อยาในกลุ่ม echinocandin ในการศึกษาการกลายพันธุ์ในยีนดังกล่าวสามารถใช้วิธี PCR-based sequencing จนถึงวิธี whole genome sequencing (WGS)[37] เช่น AsperGenius multiplex real-time PCR นอกจากจะสามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Aspergillus* spp. โดยมีเป้าหมายอยู่ที่ 28S ribosomal RNA แล้ว ยังสามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยของ *cyp51A* ซึ่งอาจนำไปสู่การดื้อยากลุ่ม azole ได้ เช่น TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A โดยที่การทดสอบนี้เป็นการทดสอบโดยตรงต่อน้ำล้างปอด ใช้วิธีการวิเคราะห์ melting curve[45] จากการศึกษาความไวในการตรวจหาเชื้อ *Aspergillus* จากผู้ป่วยโรคโลหิตวิทยา และผู้ป่วยใน intensive care unit เปรียบเทียบกับ galactomannan assay พบว่ามีความไวและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อมากกว่าร้อยละ 80 และนอกจากนั้นยังช่วยในการทำนายโรค และการตอบสนองต่อการรักษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Aspergillus* spp. จากภาวะดื้อยาของเชื้อได้อีกด้วย[46, 47] อย่างไรก็ตามเนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่อง commercial kits ทำให้การศึกษาหรือการตรวจหาภาวะดื้อยาในกลุ่มนี้ยังขึ้นอยู่กับ in-house molecular methods ในเชิงวิจัย โดยเฉพาะวิธีการ next-generation sequencing ต่อยีนที่มีการกลายพันธุ์ *ERG11* และ *CYP51A* ซึ่งยังคงมีความหลากหลายในวิธีการขึ้นอยู่กับแต่ละสถาบัน ในอนาคตหากมีการรวบรวมและตีพิมพ์เป็นวิธีการมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ อาจสามารถนำไปสู่การบ่งชี้ภาวะดื้อยาของเชื้อราเหล่านี้ได้อย่างแม่นยำ โดยมีการเปรียบเทียบร่วมกับวิธีการ antifungal susceptibility test ต่อไป

บทสรุป

อัตราการติดเชื้อราเพิ่มสูงขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นการติดเชื้อแทรกซ้อนจากการติดเชื้ออื่น โดยเฉพาะในช่วงภาวะโควิด 2019 นอกจากนั้นอัตราการดื้อยาต้านเชื้อรายังพบสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง การรักษาโรคติดเชื้อรามีการเปลี่ยนแปลงตามอัตราการพบเชื้อและอัตราการดื้อยา

ของเชื้อ ดังนั้นการตรวจหาภาวะดื้อยาของเชื้อจึงมีความสำคัญมากขึ้นตามลำดับ เพื่อสรรหายาต้านเชื้อราที่เหมาะสมในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อราแบบลุกลาม สำหรับข้อมูลความไวรับของเชื้อราต่อยาต้านเชื้อราในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด ทำให้ยากต่อการเลือกใช้ยาในการรักษาโรคติดเชื้อรา การรณรงค์ให้ตระหนักถึงความจำเป็นในการศึกษาความไวรับยาต้านเชื้อราและการจัดทำสถิติความไวรับของแต่ละเชื้อในแต่ละโรงพยาบาลจึงมีความสำคัญในการเฝ้าระวังและป้องกันการเกิดเชื้อดื้อยาในอนาคต รวมทั้งการสนับสนุนการใช้ยาต้านเชื้อราอย่างสมเหตุสมผลมีความสำคัญในการป้องกันการดื้อยาและช่วยลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่ติดเชื้อราในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราดื้อยา รวมทั้งการตรวจหาภาวะดื้อยาของเชื้อรา จึงมีประโยชน์ในการเฝ้าระวัง ในการรักษา ในการเลือกยาให้เหมาะสมแก่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อรา และในที่สุดประโยชน์จากการรักษาอย่างเหมาะสมจะสะท้อนจากอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยติดเชื้อราที่ลดลง และการเพิ่มคุณภาพชีวิตที่ดีของผู้ป่วยที่ติดเชื้อราต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Thailand. Office of the National Economic and Social Development Board 2010 [Available from: http://social.nesdb.go.th/SocialStat/StatSubDefault_Final.aspx?catid=3.
2. Wilkendorf LS, Bowles E, Buil JB, van der Lee HAL, Posteraro B, Sanguinetti M, et al. Update on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Identification of Filamentous Fungi. J Clin Microbiol. 2020;58(12).
3. Koehler P, Bassetti M, Chakrabarti A, Chen SCA, Colombo AL, Hoenigl M, et al. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. Lancet Infect Dis. 2021;21(6):e149-e62.
4. Kume H, Yamazaki T, Togano T, Abe M, Tanuma H, Kawana S, et al. Epidemiology of visceral mycoses in autopsy cases in Japan: comparison of the data from 1989, 1993, 1997, 2001, 2005 and 2007 in Annual of Pathological Autopsy Cases in Japan. Med Mycol J. 2011;52(2):117-27.
5. Yamazaki T, Kume H, Murase S, Yamashita E, Arisawa M. Epidemiology of visceral mycoses: analysis of data in annual of the pathological autopsy cases in Japan. J Clin Microbiol. 1999;37(6):1732-8.
6. Chakrabarti A, Chatterjee SS, Shivaprakash MR. Overview of opportunistic fungal

infections in India. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2008;49(3):165-72.

7. Chakrabarti A, Chatterjee SS, Das A, Panda N, Shivaprakash MR, Kaur A, et al. Invasive zygomycosis in India: experience in a tertiary care hospital. Postgrad Med J. 2009;85(1009):573-81.
8. Slavin MA. The epidemiology of candidaemia and mould infections in Australia. J Antimicrob Chemother. 2002;49 Suppl 1:3-6.
9. Heath CH, Slavin MA, Sorrell TC, Handke R, Harun A, Phillips M, et al. Population-based surveillance for scedosporiosis in Australia: epidemiology, disease manifestations and emergence of Scedosporium aurantiacum infection. Clin Microbiol Infect. 2009;15(7):689-93.
10. Chaiwarith R, Fakthongyoo A, Praparattanapan J, Boonmee D, Sirisanthana T, Supparatpinyo K. Itraconazole vs Fluconazole as a Primary Prophylaxis for Fungal Infections in HIV-Infected Patients in Thailand. Curr HIV Res. 2011.
11. Ungpakorn R. Mycoses in Thailand: current concerns. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2005;46(2):81-6.
12. Chariyalertsak S, Supparatpinyo K, Sirisanthana T, Nelson KE. A controlled trial of itraconazole as primary prophylaxis for systemic fungal infections in patients with advanced human immunodeficiency virus infection in Thailand. Clin Infect Dis. 2002;34(2):277-84.
13. Chariyalertsak S, Sirisanthana T, Saengwonloey O, Nelson KE. Clinical presentation and risk behaviors of patients with acquired immunodeficiency syndrome in Thailand, 1994--1998: regional variation and temporal trends. Clin Infect Dis. 2001;32(6):955-62.
14. Mahaisavariya P, Chaiprasert A, Sivayathorn A, Khemngern S. Deep fungal and higher bacterial skin infections in Thailand: clinical manifestations and treatment regimens. Int J Dermatol. 1999;38(4):279-84.
15. Sukroongreung S, Nilakul C, Ruangsomboon O, Chuakul W, Eampokalap B. Serotypes of Cryptococcus neoformans isolated from patients prior to and during the AIDS era in Thailand. Mycopathologia. 1996;135(2):75-8.
16. Imwidthaya P. Systemic fungal infections in Thailand. J Med Vet Mycol. 1994;32(5):395-9.
17. Kiertiburanakul S, Thibbadee C, Santanirand P. Invasive aspergillosis in a tertiary-care hospital in Thailand. J Med Assoc Thai. 2007;90(5):895-902.
18. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers:

human fungal infections. Sci Transl Med. 2012;4(165):165rv13.

19. Perfect JR. The antifungal pipeline: a reality check. Nat Rev Drug Discov. 2017;16(9):603-16.
20. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. Microbiol Mol Biol Rev. 2011;75(2):213-67.
21. Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, Rijs AJ, Varga J, Samson RA, et al. Emergence of azole resistance in Aspergillus fumigatus and spread of a single resistance mechanism. PLoS Med. 2008;5(11):e219.
22. Fisher MC, Alastruey-Izquierdo A, Berman J, Bicanic T, Bignell EM, Bowyer P, et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. Nat Rev Microbiol. 2022;20(9):557-71.
23. Vanden Bossche H. Biochemical targets for antifungal azole derivatives: hypothesis on the mode of action. Curr Top Med Mycol. 1985;1:313-51.
24. Yoshida Y, Aoyama Y. Interaction of azole antifungal agents with cytochrome P-45014DM purified from Saccharomyces cerevisiae microsomes. Biochem Pharmacol. 1987;36(2):229-35.
25. Yoshida Y. Cytochrome P450 of fungi: primary target for azole antifungal agents. Curr Top Med Mycol. 1988;2:388-418.
26. Chowdhary A, Sharma C, Hagen F, Meis JF. Exploring azole antifungal drug resistance in Aspergillus fumigatus with special reference to resistance mechanisms. Future Microbiol. 2014;9(5):697-711.
27. Prigitano A, Venier V, Cogliati M, De Lorenzis G, Esposto MC, Tortorano AM. Azole-resistant Aspergillus fumigatus in the environment of northern Italy, May 2011 to June 2012. Euro Surveill. 2014;19(12):20747.
28. Vermeulen E, Lagrou K, Verweij PE. Azole resistance in Aspergillus fumigatus: a growing public health concern. Curr Opin Infect Dis. 2013;26(6):493-500.
29. 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):513-20.
30. van Ingen J, van der Lee HA, Rijs TA, Zoll J, Leenstra T, Melchers WJ, et al. Azole, polyene and echinocandin MIC distributions for wild-type, TR34/L98H and TR46/

Y121F/T289A Aspergillus fumigatus isolates in the Netherlands. J Antimicrob Chemother. 2015;70(1):178-81.

31. Hamilton-Miller JM. Fungal sterols and the mode of action of the polyene antibiotics. Adv Appl Microbiol. 1974;17(0):109-34.
32. Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP, Torrado-Santiago S. Amphotericin B formulations and drug targeting. J Pharm Sci. 2008;97(7):2405-25.
33. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3rd ed. CLSI supplement M27M44S: Clinical and Laboratory Standards Institute, USA; 2022.
34. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3rd ed. CLSI supplement M38M51S: Clinical and Laboratory Standards Institute, USA; 2022.
35. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2016;62(4):e1-50.
36. Alastruey-Izquierdo A, Melhem MS, Bonfietti LX, Rodriguez-Tudela JL. Susceptibility Test for Fungi: Clinical and Laboratorial Correlations in Medical Mycology. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015;57 Suppl 19:57-64.
37. Garcia-Effron G. Molecular Markers of Antifungal Resistance: Potential Uses in Routine Practice and Future Perspectives. J Fungi (Basel). 2021;7(3).
38. Iriart X, Lavergne RA, Fillaux J, Valentin A, Magnaval JF, Berry A, et al. Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight system with a new time-effective strategy. J Clin Microbiol. 2012;50(6):2107-10.
39. Guarro J, GeneJ, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev. 1999;12(3):454-500.
40. Irinyi L, Lackner M, de Hoog GS, Meyer W. DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. Fungal Biol. 2016;120(2):125-36.
41. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus. Stud Mycol. 2014;78:141-73.

42. van Diepeningen AD, Feng P, Ahmed S, Sudhadham M, Bunyaratavej S, de Hoog GS. Spectrum of Fusarium infections in tropical dermatology evidenced by multilocus sequencing typing diagnostics. Mycoses. 2015;58(1):48-57.
43. Simor AE, Porter V, Mubareka S, Chouinard M, Katz K, Vermeiren C, et al. Rapid Identification of Candida Species from Positive Blood Cultures by Use of the FilmArray Blood Culture Identification Panel. J Clin Microbiol. 2018;56(12).
44. Pelzer BW, Seufert R, Koldehoff M, Liebregts T, Schmidt D, Buer J, et al. Performance of the AsperGenius(R) PCR assay for detecting azole resistant Aspergillus fumigatus in BAL fluids from allogeneic HSCT recipients: A prospective cohort study from Essen, West Germany. Med Mycol. 2020;58(2):268-71.
45. Chong GL, van de Sande WW, Dingemans GJ, Gaajetaan GR, Vonk AG, Hayette MP, et al. Validation of a new Aspergillus real-time PCR assay for direct detection of Aspergillus and azole resistance of Aspergillus fumigatus on bronchoalveolar lavage fluid. J Clin Microbiol. 2015;53(3):868-74.
46. Perlin DS, Wiederhold NP. Culture-Independent Molecular Methods for Detection of Antifungal Resistance Mechanisms and Fungal Identification. J Infect Dis. 2017;216(suppl_3):S458-S65.
47. Chong GM, van der Beek MT, von dem Borne PA, Boelens J, Steel E, Kampinga GA, et al. PCR-based detection of Aspergillus fumigatus Cyp51A mutations on bronchoalveolar lavage: a multicentre validation of the AsperGenius assay(R) in 201 patients with haematological disease suspected for invasive aspergillosis. J Antimicrob Chemother. 2016;71(12):3528-35.