



Rijksinstituut voor Volksgezondheid  
en Milieu  
Ministerie van Volksgezondheid,  
Welzijn en Sport

> Retouradres Postbus 1 3720 BA Bilthoven

Ministerie van VWS  
T.a.v. Drs. P.H.A.M. Huijts

Ministerie van EL&I  
T.a.v. Ir. A.M. Burger

A. van Leeuwenhoeklaan 9  
3721 MA Bilthoven  
Postbus 1  
3720 BA Bilthoven  
www.rivm.nl  
KvK Utrecht 30276683  
T 030 274 91 11  
F 030 274 29 71  
info@rivm.nl

**Ons kenmerk**  
277/10 Cib/RC/RR/pg  
T (030) 274 7000  
F (030) 274 4455

Datum: 27 oktober 2010

Onderwerp: Advies n.a.v. het deskundigenberaad 'Invasieve *Aspergillus fumigatus*-infecties en de ontwikkeling van azolenresistentie'

Geachte mevrouw Burger, geachte heer Huijts,

Op 15 oktober jl. heb ik een deskundigenberaad belegd over het onderwerp 'Invasieve *Aspergillus fumigatus*-infecties en de ontwikkeling van azolenresistentie'. Aanleiding voor het beraad is recent onderzoek van professor Verweij c.s. (arts-microbioloog, UMC St Radboud, Nijmegen) waaruit blijkt dat sinds enkele jaren in meerdere ziekenhuizen in Nederland de incidentie toeneemt van invasieve infecties veroorzaakt door *Aspergillus fumigatus* die resistent is tegen behandeling met azolen.

#### *Achtergrond*

*Aspergillus* is een schimmelsoort die veelvuldig voorkomt in de omgeving, waaronder rottend plantaardig materiaal, en zodoende wordt aangetroffen in onder meer potgrond en compost. Het inademen van de sporen van de schimmel leidt bij gezonde mensen zelden tot problemen, maar voor een beperkte groep patiënten met specifieke risicofactoren kan een invasieve infectie met deze schimmel (invasieve aspergillose) zeer ernstig of dodelijk verlopen. Een dergelijke infectie kon, voordat er sprake was van resistentie, in ongeveer de helft van de gevallen succesvol bestreden worden met zogenaamde azolen. Echter, in 1998 is in Nederland voor het eerst een stam aangetoond die resistent is voor de behandeling met azolen. Een recent prospectief onderzoek waar zeven UMC's aan deelnemen wees uit dat azoolresistentie nu in heel Nederland voorkomt.

#### *Klinische consequenties*

Een invasieve infectie met *Aspergillus* treedt vooral op bij patiënten die opgenomen zijn op de intensive care en bij patiënten met een verzwakt immuunsysteem, zoals dat het geval is bij patiënten met hematologische maligniteiten en patiënten die een stamceltransplantatie hebben ondergaan. Vaak betreft het patiënten die ondanks hun ernstige aandoening goede kans op herstel zouden hebben, maar vanwege de invasieve *Aspergillus*-infectie conditioneel verslechteren of komen te overlijden. Uit onderzoek blijkt dat in Nederland naar schatting 200 tot 400 patiënten invasieve aspergillose ontwikkelen. De mortaliteit



**Datum**  
12 oktober 2010  
**Ons kenmerk**

onder deze groep patiënten bedraagt 25-50%. In 22 tot 36 gevallen per jaar gaat het om een infectie met een resistente stam. De mortaliteit van infecties met een resistente stam is, hoewel gebaseerd op kleine aantallen patiënten, berekend op 86%.

*Aspergillus*-infecties worden behandeld met azolen, zogenaamde antimycotica, die gebruikt worden in zowel de geneeskunde als de diergeneeskunde, gewasbescherming, desinfectie, en materiaalbescherming. Onder de groep van azolen valt een aantal verschillende geneesmiddelen, waaronder het middel van eerste keuze; voriconazol. Naast voriconazol zijn er enkele alternatieven, maar deze zijn zeer kostbaar (AmBisome) of beperkt effectief (Caspofungine). Resistente stammen zijn volledig ongevoelig voor voriconazol. Dit houdt in dat infecties met resistente *Aspergillus* niet adequaat behandeld kunnen worden, wat nadelige gevolgen heeft voor de patiënt.

#### *Consequenties voor de volksgezondheid*

Uit onderzoek van het UMC St Radboud blijkt dat er één dominant mechanisme is dat de resistentie veroorzaakt. Dit mechanisme, dat uit een combinatie van mutaties bestaat, is aanwezig in 94% van alle isolaten waarbij resistentie is aangetoond. Het mechanisme is waarschijnlijk midden jaren negentig ontstaan waarna resistente stammen zich geografisch verspreid hebben, waarschijnlijk vanwege selectiedruk. Recent is een nieuw mechanisme aangetoond dat tot resistentie leidt in *Aspergillus*-stammen afkomstig van patiënten met door *Aspergillus* veroorzaakte ziekten. Er zijn sterke aanwijzingen dat stammen met dit mechanisme zich eveneens over Nederland hebben verspreid.

Resistentie wordt zowel bij stammen afkomstig uit het milieu als bij stammen afkomstig van patiënten aangetroffen. Omdat resistentie is aangetoond in compost en bloembedden, maar vooralsnog niet in bodemonsters van verschillende andere locaties, is het aannemelijk dat resistentie is ontstaan als gevolg van het gebruik van fungiciden in de agrarische sector en niet onder druk van medische behandeling.

Er is onvoldoende inzicht in de relatie tussen het gebruik van azolen in en buiten de landbouw, het ontstaan van resistentie, de verspreiding van residuen van azolen en de verspreiding van resistente stammen. Resistente *Aspergillus* kan verspreid worden via de lucht, met voedselgewassen, producten en materialen, en zich al dan niet handhaven en uitbreiden onder druk van residuen in materialen en (afval)producten. De geografische schaal waarop de problematiek speelt is naar verwachting groter dan Nederland.

Ook het inzicht in de omvang van de problematiek in Nederland is niet volledig. Vrijwel alle UMC's werken momenteel vrijwillig samen aan surveillance, maar perifere ziekenhuizen maken nog geen deel uit van dit netwerk. Omdat infecties met *Aspergillus* relatief weinig voorkomen is de expertise van de verschillende microbiologische laboratoria beperkt – resistentiebepaling vindt dus niet in alle ziekenhuizen plaats. De deskundigen pleiten voor het instellen van een



**Datum**  
12 oktober 2010  
**Ons kenmerk**

referentielaboratorium. Isolaten uit het hele land kunnen dan gestandaardiseerd op resistentie worden onderzocht.

Onbekend is in hoeverre andere landen in Europa kampen met dezelfde problematiek. In Engeland, België, Denemarken en Spanje zijn patiënten gevonden met resistente stammen, in Noorwegen en Denemarken zijn resistente stammen in het milieu aangetroffen. De cijfers geven echter geen goede indicatie van de omvang van het probleem; in veel landen wordt *Aspergillus* niet op resistentie onderzocht en betreft het toevallige bevindingen. Over het voorkomen in de omgeving is vrijwel niets bekend. Een omgevingsstudie is nodig om de rol van fungiciden en de verspreiding van resistente stammen in kaart te brengen.

*Te ondernemen stappen:*

1. Het deskundigenberaad adviseert de Stichting Werkgroep Antibiotica Beleid (SWAB) om de bestaande richtlijn aspergillose te herzien en beleid op te nemen dat voorziet in richtlijnen voor het screenen van patiënten op (resistente) *Aspergillus* en behandelbeleid indien resistentie wordt aangetoond.
2. Het deskundigenberaad adviseert een referentielaboratorium in te stellen voor invasieve aspergillose zodat het inzicht in de omvang van de problematiek in Nederland verbeterd wordt. Het laboratorium van het UMC St Radboud is hiervoor de aangewezen kandidaat gezien de specifieke expertise op dit vlak. Dit expertisecentrum dient ook zorg te dragen voor verzameling van klinisch-epidemiologische gegevens van patiënten met (resistente) aspergillose alsmede voor klinische advisering aan behandelaren. Dit initiatief zal nauw aansluiten op het bestaande Infectieziekten Surveillance Informatie Systeem – Antibiotica Resistentie (ISIS-AR) van het RIVM/Cib, zodat gegevens van laboratoria en epidemiologische gegevens systematisch verzameld worden.
3. Het deskundigenberaad benadrukt het belang van een complexe omgevingsstudie waarbij wordt onderzocht waar resistente stammen voorkomen, welke verspreidingsroutes er zijn, wat de rol is van fungiciden in het ontstaan en selecteren van resistentie, hoe personen aan resistente stammen blootgesteld worden en op welke wijze blootstelling aan *Aspergillus* voorkomen kan worden. Een dergelijke studie zou uitgevoerd kunnen worden door onder meer de Universiteit Wageningen in samenwerking met het UMC St Radboud en het RIVM/Cib/MEV. Op dit moment is er, in afwachting van meer gegevens over eventuele beroepsgerelateerde blootstelling, geen reden voor arbeidsgeneeskundige maatregelen.
4. Het deskundigenberaad benadrukt dat aandacht voor dit probleem op Europees niveau van belang is. De deskundigen verzoeken het Cib om de ECDC te vragen dit probleem op de agenda te zetten.

Ik ben voornemens de situatie met enige regelmaat te bespreken met de deskundigen.



**Datum**  
12 oktober 2010  
**Ons kenmerk**

Met vriendelijke groet,

Prof. Dr. R.A. Coutinho  
Directeur Centrum Infectieziektebestrijding

> Retouradres Postbus 19506 2500 CM Den Haag

**Bureau Risicobeoordeling  
en  
Onderzoeksprogrammering**  
Prinses Beatrixlaan 2  
2595 AL Den Haag  
Postbus 19506  
2500 CM Den Haag  
T 070 448 40 72  
F 070 448 40 71  
www.vwa.nl

**Onze referentie**  
nVWA/BuRO/2010/22718

**Datum**  
5 oktober 2010

## **Advies van de directeur bureau Risicobeoordeling en Onderzoeksprogrammering Aan de ministers van LNV, VROM en VWS**

### **Resistentie van *Aspergillus fumigatus* tegen azool fungiciden**

De schimmel *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) kan een scala van ziektebeelden (aspergillose) veroorzaken bij de mens, variërend van allergische beelden tot levensbedreigende invasieve aspergillose. Het levensbedreigende invasieve ziektebeeld komt in Nederland jaarlijks bij enkele honderden patiënten voor, die doorgaans al ernstig verzwakt zijn. Geneesmiddelen die hierbij doorgaans als eerste keus worden gebruikt behoren tot de groep van azolen. Resistentie van de veroorzakende schimmel tegen azolen is geassocieerd met extra kosten en een verhoogde kans op overlijden. In Nederlandse ziekenhuizen wordt resistentie tegen azolen waargenomen bij circa 6-13% van de stammen die bij patiënten met deze infecties worden geïsoleerd.

Azolen worden niet alleen in de humane geneeskunde, maar ook in de landbouw en als bestanddeel van desinfectiemiddelen gebruikt voor de bestrijding van schimmels, waaronder *A. fumigatus*. Recent zijn bij patiënten met aspergillose stammen van *A. fumigatus* aangetroffen die een vorm van resistentie tegen azolen hadden die ook in landbouw-gerelateerde stammen voorkomt. Deze vorm van resistentie verschilt van die in stammen die door medisch gebruik van azolen resistent zijn geworden. Omdat de betreffende patiënten niet eerder met azolen waren behandeld, lijkt het waarschijnlijk dat de resistentie op andere wijze is ontstaan. Dit zou kunnen zijn in de landbouw, waar deze middelen tegen schimmelinfecties worden gebruikt of door gebruik ervan als biocide in desinfectiemiddelen. Het wordt onwaarschijnlijk geacht dat resistentie zou zijn opgetreden door blootstelling van deze patiënten aan residuen van azolen in voedselgewassen die ermee behandeld zijn. De concentraties in het bloed als gevolg van dergelijke residuen zijn daarvoor veel te laag. Besmetting met *A. fumigatus* van mens op mens komt zelden voor en speelt dan ook geen noemenswaardige rol bij resistentie-overdracht.

De directeuren Landbouw, tegenwoordig AgroKetens en Visserij, van het ministerie van LNV en Bodem-, Water- en Luchtkwaliteit van het ministerie van VROM hebben de directeur bureau Risicobeoordeling en Onderzoeksprogrammering gevraagd of er voldoende kennis beschikbaar is om

kosteneffectieve maatregelen te nemen tegen de vorming en overdracht van resistentie naar de humane gezondheidszorg. Zij vragen, als het antwoord op deze vraag negatief is, een onderzoeksprogramma te schetsen dat de benodigde kennis zal opleveren.

De conclusie is, dat de huidige kennis niet toereikend is voor een gedegen onderbouwing van maatregelen. Drie soorten gegevens zijn nodig om in die lacune te voorzien:

1. Het aantal gevallen van invasieve aspergillose door resistente *A. fumigatus* en de kosten voor de humane gezondheidszorg.
2. Het percentage van deze gevallen dat berust op resistentie ontstaan als gevolg van niet-medische toepassing van azolen.
3. De kosten van maatregelen om resistentievorming tegen te gaan en de baten die hiervan mogen worden verwacht.

#### *Advies*

Een samenhangend onderzoekprogramma dat de benodigde kennis kan opleveren zou de volgende componenten dienen te omvatten:

- Onderzoeken waar en in welke mate azolen in de afgelopen jaren werden toegepast in en buiten de humane gezondheidszorg.
- Via typering van resistente stammen van *A. fumigatus* de bron ervan achterhalen. Zo kan worden geschat bij welk deel hiervan de resistentie afkomstig is van niet-medisch gebruik, binnen of buiten Nederland.
- Onderzoeken in welke mate en op welke termijn, de resistentie van *A. fumigatus* afneemt als het gebruik van azolen wordt gestaakt en vervangen door alternatieve schimmeldodende middelen.
- Schatten hoeveel extra kosten zijn gemoeid met de behandeling van patiënten met infecties door schimmels die resistent zijn tegen azolen.
- Schatten van de kosten van maatregelen die de ontwikkeling van resistentie tegen azolen verminderen en deze afzetten tegen de baten voor de gezondheidszorg.

**Bureau Risicobeoordeling  
en  
Onderzoeksprogrammering**

**Advies over resistentie van  
*Aspergillus fumigatus* tegen  
azool fungiciden**

**Datum**  
5 oktober 2010

**Onze referentie**  
nVWA/BuRO/2010/22718

## Onderbouwing

### Aanleiding

De schimmel *Aspergillus fumigatus* kan bij de mens verschillende ziekten veroorzaken variërend van allergische aandoeningen zoals ABPA (allergische bronchopulmonale aspergillose), chronische ziekten zoals het aspergilloom, en levensbedreigende infecties zoals invasieve aspergillose. De schimmel wordt veel aangetroffen in aarde, stof en plantenresten en wordt daarom geassocieerd met de agrarische sector. Bij de meeste mensen leidt blootstelling aan de schimmel niet tot infectie. De levensbedreigende infecties treden voornamelijk op bij patiënten met een verzwakt immuunsysteem. Ernstig zieke patiënten in ziekenhuizen lopen een sterk verhoogde kans op een dergelijke infectie, die moeilijk te behandelen is. De eerste keus van artsen voor behandeling van een dergelijke infectie is doorgaans een middel uit de groep van azolen, omdat klinisch onderzoek laat zien dat behandeling met deze middelen leidt tot de beste resultaten. Verder zijn de azolen de enige anti-*Aspergillus* middelen die oraal gegeven kunnen worden en niet per se met behulp van een infuus. Dit is belangrijk voor de behandeling van patiënten met niet levensbedreigende vormen van *Aspergillus* ziekten en voor nabehandeling van de invasieve infecties. Vaak moeten deze patiënten gedurende maanden behandeld worden.

Azolen zijn een groep van verbindingen die niet alleen wordt gebruikt als humaan geneesmiddel, maar ook als gewasbeschermingsmiddelen tegen schimmels in de landbouw en als biociden in schoonmaak- en desinfectiemiddelen. In de afgelopen 10 jaar is resistentie ontstaan in *Aspergillus fumigatus* tegen azolen. Deze resistentie bemoeilijkt de behandeling van geïnfecteerde patiënten en leidt daarom tot extra ziektelast en hogere kosten. Het vermoeden bestaat dat een deel van de aangetroffen resistentie door gebruik van azolen buiten de humane gezondheidszorg is geselecteerd. Dit kan zijn gebruik in de landbouwsector, of als desinfectiemiddel. Hoewel moleculair biologisch onderzoek sterke aanwijzingen levert voor een bijdrage van de landbouwsector en het gebruik van desinfectiemiddelen op basis van azolen aan het probleem van azolenresistente *Aspergillus*, kan deze veronderstelling op basis van de huidige kennis nog niet bewezen worden geacht.

Het geschatte aantal gevallen van invasieve aspergillose in Nederland ligt tussen de 200 en 400 per jaar. De prevalentie van overige *Aspergillus* ziekten liggen waarschijnlijk een factor 3 hoger. Ongeveer 4,5% van de 1792 onderzochte *A. fumigatus* isolaten was resistent tegen azolen. In academische ziekenhuizen varieerde het percentage patiënten met aspergillose waarbij azolen resistentie werd vastgesteld tussen de 6 en de 14%. Tweederde van de patiënten bij wie de resistente stammen aangetroffen werden waren niet behandeld met azolen in de voorafgaande 3 maanden, dus is het onwaarschijnlijk dat die resistentie als gevolg van een behandeling is ontstaan. Deze notie wordt bevestigd doordat 92% van de stammen resistent was op basis van hetzelfde mechanisme, aangeduid als TR/L98H, terwijl infecties van mens op mens niet voorkomen. Infectie met een resistente stam is geassocieerd met een belangrijk grotere kans op therapiefalen. Bij invasieve aspergillose is dit direct geassocieerd met een hogere kans (>85%) op overlijden dan door infectie met een gevoelige variant. De behandeling van een infectie met een resistente stam is beduidend duurder, mede omdat er duurdere medicijnen moeten worden toegepast, die bovendien uitsluitend met een infuus kunnen worden toegediend.

Bureau Risicobeoordeling  
en  
Onderzoeksprogrammering

Advies over resistentie van  
*Aspergillus fumigatus* tegen  
azool fungiciden

Datum  
5 oktober 2010

Onze referentie  
nVWA/BuRO/2010/22718

### Vragen van de ministeries van LNV en VROM

De directeuren Landbouw van het ministerie van LNV en Bodem-, Water- en Luchtkwaliteit van het ministerie van VROM hebben de volgende vragen gesteld:

1. Is het met de huidige kennis van dit probleem reeds mogelijk gerichte en kostenefficiënte maatregelen op te stellen om dit probleem het hoofd te bieden? Zo ja, welke?
2. Indien dit niet het geval is, kunt u dan aangeven welke informatie ontbreekt die nodig zou zijn om een advies over maatregelen op te baseren.
3. Kunt u een onderzoeksproject schetsen dat de benodigde kennis op kan leveren?

### Antwoorden

*Is het met de huidige kennis van dit probleem reeds mogelijk gerichte en kostenefficiënte maatregelen op te stellen om dit probleem het hoofd te bieden? Zo ja, welke?*

Het antwoord op de eerste vraag is dat om maatregelen te kunnen voorstellen om de resistentie van *A. fumigatus* voor fungiciden tegen te gaan, bekend moet zijn op welke wijze die resistentie wordt opgebouwd en hoeveel van de resistentie die in de medische sector aangetroffen wordt, is geselecteerd in de agrarische sector of door gebruik als biocide. De onderzoekers van het UMC St Radboud suggereren dat het mogelijk is dat resistentie gevonden in stammen van *A. fumigatus* geïsoleerd uit patiënten geselecteerd wordt door gebruik van azolen bevattende fungiciden in de agrarische sector. Deze conclusie wordt niet algemeen gedeeld. Azolen worden ook gebruikt in desinfectiemiddelen, maar het is niet bekend of het gebruik van dergelijke middelen in ziekenhuizen heeft geleid tot resistentie van de in ziekenhuizen aanwezige *A. fumigatus* stammen, die vervolgens patiënten kunnen infecteren. Er zijn meerdere soorten azolen, bijvoorbeeld triazolen, isothiazolen, en benzimidazolen. Wat niet bekend is welk middel en welke wijze van gebruik en blootstelling leidt tot hoeveel resistentie. Daarom kan op dit moment geen voorstel gedaan worden voor kosteneffectieve maatregelen om de risico's van resistentie in *A. fumigatus* te voorkomen.

*Indien dit niet het geval is, kunt u dan aangeven welke informatie ontbreekt die nodig zou zijn om een advies over maatregelen op te baseren.*

Drie soorten gegevens zijn nodig om de kosten en baten te schatten voor beheersmaatregelen:

- Wel deel van de resistentie tegen fungiciden van *A. fumigatus* aangetroffen in de humane gezondheidszorg is geselecteerd in de agrarische sector en welk deel door overig niet-medisch gebruik?
- Welke kosten voor behandeling en verloren levensjaren worden door azolenresistente *A. fumigatus* veroorzaakt?
- Welke kosten zou uitbanning van gebruik van azolen buiten de humane gezondheidszorg met zich meebrengen?

Dat selectie voor resistentie tegen fungiciden optreedt onder schimmels in de agrarische sector staat buiten kijf. Azolen vormen de enige klasse van fungiciden die zowel bij patiënten als in de landbouw gebruikt worden. Daarnaast worden de betreffende azool-fungiciden ook gebruikt als biocide in industriële en huishoudelijke toepassingen en in consumentenproducten. Resistentie tegen azolen werd al eerder gevonden in patiënten, waarbij een verscheidenheid aan mutaties aangetoond werd. Recentelijk is echter dezelfde set van twee mutaties die gezamenlijk resistentie veroorzaken, aangetroffen in 94% van de klinische isolaten uit Nederlandse ziekenhuizen. De patiënten waren niet eerder met azolen

Bureau Risicobeoordeling  
en  
Onderzoeksprogrammering

Advies over resistentie van  
*Aspergillus fumigatus* tegen  
azool fungiciden

Datum  
5 oktober 2010

Onze referentie  
nVWA/BuRO/2010/22718



behandeld. Dezelfde mutaties zijn ook in *A. fumigatus* in de landbouw aangetroffen. Omdat overdracht van mens op mens zelden voorkomt, duidt dit erop dat de infecties veroorzaakt zijn door stammen die buiten de nog niet met azolen behandelde patiënt resistent geworden zijn. Bewezen is echter nog niet dat het gebruik in de agrarische sector hieraan ten grondslag ligt. In hoeverre het gebruik van azolen als biocide in desinfectiemiddelen bijdraagt aan de algehele problematiek is niet bekend. Attributie van de in patiënten met aspergillose aangetroffen resistentie is daarom noodzakelijk.

In 2002 concludeerde het Scientific Steering Committee (SSC) van de EU Commissie dat de resistentie van pathogene schimmels tegen azolen geen gezondheidsprobleem vormde, omdat de frequentie van resistentie niet verder toenam en omdat in de humane gezondheidszorg geen stammen gevonden werden die in de agrarische sector resistent waren geworden. Wel beval het SSC aan de situatie te blijven monitoren en onderzoek te doen op epidemiologisch en laboratoriumniveau. Precies die twee methoden liggen ten grondslag aan het artikel in Lancet Infectious Diseases waar de vraag van de ministeries van LNV en VROM uit voortvloeit. De conclusie van het SSC uit 2002 dat resistentie van pathogene schimmels tegen azolen geen bedreiging vormt voor de humane gezondheid wordt ontkracht door de ontwikkelingen sindsdien. In zijn rapport heeft het SSC met deze mogelijkheid al rekening gehouden en aanbevelingen gedaan die voor de huidige situatie relevant zijn. In lijn met deze aanbevelingen volgt hieronder een voorstel voor onderzoek dat de basis kan vormen voor te nemen beleidsmaatregelen.

### **Onderzoek**

*Kunt u een onderzoeksproject schetsen dat de benodigde kennis op kan leveren?*  
De eerste van de bovengenoemde hoofdvragen kan uitgewerkt worden in twee lijnen van onderzoek:

1. een laboratorium- en veldonderzoek naar de opbouw van resistentie van pathogene schimmels tegen azolen.
2. onderzoek naar de overdracht van resistentiegenen van *A. fumigatus* van de agrarische en andere relevante sectoren naar de humane sector (geïnficeerde patiënten) en de kosten die daar uit voortvloeien.

Het laboratoriumonderzoek zou zich moeten richten op verwerving van resistentie tegen azolen door schimmels. In eerste instantie zou moeten worden uitgezocht of de klinische stammen overeenkomen met die uit het veld en of de resistentie door dezelfde mutaties wordt veroorzaakt. Vervolgens hoe vaak hetzelfde resistentie mechanisme wordt geselecteerd en in hoeverre de verworven resistentie vermindert wanneer de selectiedruk wordt weggenomen. Andere vragen zijn tegen welke azolen er resistentie is en in het bijzonder of deze alleen in de landbouw toegepast worden of ook in huishoudelijke producten zoals desinfectiemiddelen, antischimmelcrèmes, zeep, shampoo, cosmetica, drukinkt, verf en antischimmelsprays. Een veldonderzoek zou vervolgens kunnen nagaan in hoeverre de bevindingen uit het laboratoriumonderzoek passen bij de situatie in de landbouw.

Het tweede deel van de eerste hoofdvraag kan uit gewerkt worden met behulp van epidemiologische methodiek. Deze lijn van onderzoek moet zich richten op alle gegevens die een verband tussen de landbouw en de humane sector kunnen bevestigen of ontkrachten. Op zich is een sterke overeenkomst tussen een resistentie veroorzakende mutatie die buiten het ziekenhuis is opgetreden en

**Bureau Risicobeoordeling  
en  
Onderzoeksprogrammering**

**Advies over resistentie van  
*Aspergillus fumigatus* tegen  
azool fungiciden**

**Datum**  
5 oktober 2010

**Onze referentie**  
nVWA/BuRO/2010/22718

dezelfde mutatie in patiënten nog geen bewijs voor een causaal verband. Afhankelijk van hoe sterk de overeenkomst is en of er aanvullende gegevens in dezelfde richting wijzen, kan dit toch voldoende onderbouwing zijn voor het overwegen van maatregelen. Het is wenselijk te inventariseren welke routes van blootstelling de grootste bijdrage leveren: rechtstreekse blootstelling aan bronnen op relatief korte afstand of indirecte blootstelling aan veel verder gelegen bronnen door verspreiding van de schimmel over grote afstand met de wind.

De tweede hoofdvraag is economisch van aard. Als bepaald is dat er een verband is tussen resistentie die geselecteerd is buiten de humane gezondheidszorg en humane ziektekosten, dan is de eerste vraag hoeveel die kosten, in de breedste zin van het woord, zijn. Het betreft alle extra kosten van behandeling van patiënten die aspergillose oplopen met een resistente stam, in vergelijking met een gevoelige stam en de verloren gezonde levensjaren als gevolg van therapiefalen. De tweede vraag wordt vervolgens hoe de kosten van effectieve maatregelen zich verhouden tot die extra zorgkosten en het verlies aan levensjaren. De kosten van maatregelen bestaan uit hogere kosten voor alternatieve bestrijdingsmiddelen, oogstverliezen en andere producten die verloren gaan doordat schimmelinfecties niet meer bestreden kunnen worden of kwaliteitsvermindering van producten die nog wel op de markt gebracht kunnen worden. Het is uiteraard weinig zinvol de landbouwsector of andere relevante sectoren hoge kosten te laten maken als de vermindering van de ziektelast niet op zijn minst evenredig is.

Hoogachtend,

Prof. dr. E.G. Schouten  
*Directeur bureau Risicobeoordeling en Onderzoeksprogrammering*

Bijlagen: 3

**Bureau Risicobeoordeling  
en  
Onderzoeksprogrammering**

**Advies over resistentie van  
Aspergillus fumigatus tegen  
azool fungiciden**

**Datum**  
5 oktober 2010

**Onze referentie**  
nVWA/BuRO/2010/22718

## **Bijlagen**

1. Science: 326 pagina 1173, 27 november 2009
2. The Lancet Infectious Diseases 7 pagina's 789-95 2009
3. Prof. Dr. P.E. Verweij: Azool resistentie in *Aspergillus fumigatus* in Nederland  
Notitie in antwoord op vragen van het bureau Risicobeoordeling en  
Onderzoeksprogrammering

**Bureau Risicobeoordeling  
en  
Onderzoeksprogrammering**

**Advies over resistentie van  
*Aspergillus fumigatus* tegen  
azool fungiciden**

**Datum**  
5 oktober 2010

**Onze referentie**  
nVWA/BuRO/2010/22718



## INFECTIOUS DISEASES

# Farm Fungicides Linked to Resistance in a Human Pathogen

A team of Dutch researchers has reignited a debate on the agricultural use of fungicides with a review in the December issue of *The Lancet Infectious Diseases*. The authors maintain that the massive use of fungicides to protect European orchards, vineyards, and grain fields may be contributing to resistance against drugs used to treat people with life-threatening infections of *Aspergillus fumigatus*. Although the overuse of antibiotics in animal husbandry is known to have caused resistance in the

human population, this would be the first time a similar link is found between farm use of fungicides and human health.

If true, the authors warn ominously, that “confronts us with a major challenge with worldwide dimensions.” But Herbert

Hof, director of the Institute for Medical Microbiology at the University of Heidelberg in Germany, accuses them of crying wolf, saying the paper amounts to “publicity seeking” by frightening the public “in the way horror films do.” The group does have its supporters, however. David Denning of the University of Manchester, who heads the United Kingdom’s National Aspergillosis Centre, says “they have a very strong case.” The leader of the team, Paul Verweij of Radboud University Nijmegen Medical Centre in the Netherlands, concedes that they haven’t yet clinched the case, but he says enough evidence has accumulated to issue a warning.

**Farmers’ friend.** Azoles are used to protect a wide variety of crops from fungi.

*A. fumigatus* causes infections, sometimes fatal, primarily in people with compromised immune systems and certain diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease. Patients are thought to become infected when they inhale spores of the fungus, which are ubiquitous in soil. Drugs of a class called azoles are doctors’ mainstay, and resistance has long been known to crop up in individual patients. The mutations in the fungus that cause the resistance usually differ from one patient to the next; in a paper published in July, for instance, Denning’s team reported finding 18 different mutations in an *Aspergillus* gene called *cyp51A* in 30 patients in the United Kingdom.

But Verweij’s team has found something strange in resistant *Aspergillus* strains in the Netherlands: In 94% of the isolates from his own hospital and 69% of those from other Dutch hospitals, the resistance was caused by a single pair of mutations—a point mutation in *cyp51A* and a so-called tandem repeat in the gene’s promoter. To Verweij, that similarity points to a new scenario: that all the patients breathed in spores that were already resistant. That’s why he believes there’s an environmental cause.

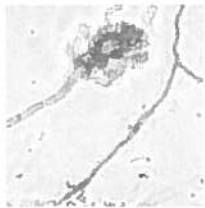
Azoles are used to ward off a range of plant pathogens and are applied on 50% of Europe’s grain and grape acreage, says plant pathologist Gert Kema of Wageningen University in the Netherlands, a co-author of the paper. Much smaller amounts are used in the United States, where farming is less-intensive and spraying is less cost-effective. But the compounds are popular in other parts of the world as well, he says.

The risk that heavy agricultural use of azoles might lead to resistance problems in people has been debated for years. In 2002, an expert panel for the European Commission concluded that it was unlikely. But since then, the evidence has been building, Verweij says. The resistant fungus found in patients is also resistant to certain agricultural fungicides, which is suggestive of a link. And in a paper published in June, his group showed that resistant *Aspergillus* could be isolated from soil in flower beds close to hospitals and in commercial compost, leaves, and seeds bought at a garden center. Thirteen of 15 of these environmental samples also had the two mutations seen in clinical isolates.

In an e-mail to *Science*, Hof called the authors “prejudiced” and said resistance in fungi is unlikely to become a major public health problem because unlike bacteria, fungi don’t swap resistance genes. Dominique Sanglard of the University Hospital in Lausanne, Switzerland, on the other hand, says the Dutch researchers seem to be on to something real, although many questions remain. A key step is to show that one or more of the azole fungicides—at least 30 of them are on the market—can actually trigger the mutations in *A. fumigatus* seen in hospitals, says Verweij; that study is already under way.

And what if the link is proven? Verweij says a ban on certain fungicides could be an option. The team has been talking to several fungicide producers, and “they aren’t very keen on studying this further,” he says. A spokesperson for Syngenta, a major azole fungicide producer, says that resistance may have arisen in other ways—such as azole use in cosmetics—and that the company is “not convinced” of a causal link.

—MARTIN ENSERINK



**Deadly mold.** Invasive *Aspergillus fumigatus* infections can be fatal.

CREDITS (TOP TO BOTTOM): CDC, HENRY ARDEN/GETTY IMAGES





## Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use?

Paul E Verweij, Eveline Snelders, Gert H J Kema, Emilia Mellado, Willem J G Melchers

Invasive aspergillosis due to multi-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* has emerged in the Netherlands since 1999, with 6.0–12.8% of patients harbouring resistant isolates. The presence of a single resistance mechanism (denoted by TR/L98H), which consists of a substitution at codon 98 of *cyp51A* and a 34-bp tandem repeat in the gene-promoter region, was found in over 90% of clinical *A. fumigatus* isolates. This is consistent with a route of resistance development through exposure to azole compounds in the environment. Indeed, TR/L98H *A. fumigatus* isolates were cultured from soil and compost, were shown to be cross-resistant to azole fungicides, and genetically related to clinical resistant isolates. Azoles are abundantly used in the environment and the presence of *A. fumigatus* resistant to medical triazoles is a major challenge because of the possibility of worldwide spread of resistant isolates. Reports of TR/L98H in other European countries indicate that resistance might already be spreading.

### Introduction

Invasive aspergillosis is an infectious disease that is difficult to manage. Patients become infected by inhaling airborne *Aspergillus* spp conidia that are released by saprophytic moulds that inhabit the environment, typically in soil and decaying organic matter (eg, compost). Despite preventive measures in hospitals, aimed at reducing the levels of airborne fungal spores, specific patient populations remain at risk. These include patients with haematological malignancy, pulmonary diseases (eg, chronic obstructive pulmonary disease), solid-organ transplant recipients, and patients treated with corticosteroids. The incidence varies from below 1% in autologous haemopoietic stem-cell transplant recipients to up to 27% in allogeneic haemopoietic stem-cell transplant patients.<sup>1</sup> The incidence in critically ill patients was found to be 2.7–6.3%.<sup>1</sup> In most high-risk patients, deposition of aspergillus spores and even subclinical infection probably happen in the community, with invasive aspergillosis becoming clinically detectable after immunosuppressive treatment during admission to hospital.<sup>2–4</sup> Patient-to-patient transmission of invasive aspergillosis is extremely uncommon, and only reports of two clusters have been published (transplantation of a contaminated allograft and a surgical wound infection).<sup>5,6</sup>

Starting adequate antifungal treatment early is thought to improve outcome. Voriconazole is recommended for the primary treatment of invasive aspergillosis,<sup>7</sup> and another triazole, posaconazole, was shown to reduce the number of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute myeloid leukaemia, myelodysplastic syndrome, and in patients with severe graft-versus-host disease when given prophylactically.<sup>8,9</sup> The role of azoles has therefore increased in the management of patients with invasive fungal diseases, most notably of invasive aspergillosis.

The increasing role of azoles might be threatened by the acquisition of resistance by opportunistic moulds. Evolution of drug resistance seems to be less prominent in fungi than in bacteria, in which horizontal transfer of

genes and accessory genetic elements across taxa provides a major source of genetic variation.<sup>10</sup> In fungi, the evolution of drug resistance is more likely to proceed by the sequential accumulation of adaptive mutations.<sup>10</sup> However, fungi are capable of rapidly adapting in response to environmental challenges by antifungal drugs. In the setting of infection in individuals coinfecting with HIV, *Candida albicans* has evolved various resistance mechanisms in response to short periods of azole exposure. Acquired resistance was also seen in *Aspergillus fumigatus* isolates cultured from patients with aspergilloma during treatment with azoles.<sup>11–13</sup>

We recently reported the rapid emergence of azole resistance in *A. fumigatus* isolates cultured from patients with invasive aspergillosis.<sup>14,15</sup> Azole resistance has emerged since 1999 in clinical *A. fumigatus* isolates from Dutch hospitals, and 6.0–12.8% of patients were found to harbour an azole-resistant isolate.<sup>14–16</sup> The phenotype of the resistant isolates was characterised by in-vitro resistance to itraconazole, and reduced activity of voriconazole and posaconazole, compared with wild-type isolates.<sup>14,15</sup> Patients with azole-resistant invasive aspergillosis presented with primary or breakthrough infection, and failed to respond to itraconazole or voriconazole treatment.<sup>14,15,17–20</sup>

We believe that, in addition to resistance development in azole-treated patients, resistance in *A. fumigatus* could also develop in the environment. An environmental route of resistance development confronts us with a major challenge with worldwide dimensions, because efficient reproduction and spread of resistant fungus in the environment can be anticipated. We discuss the evidence that supports an environmental route of resistance development in *A. fumigatus*.

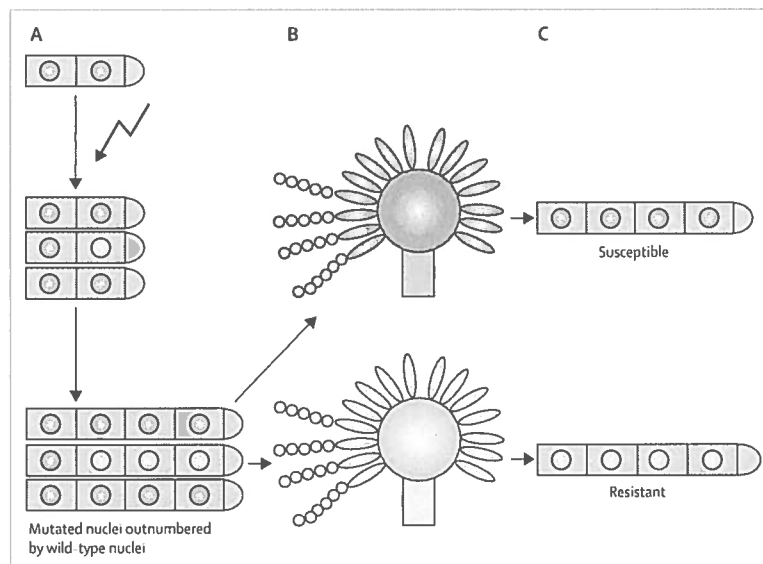
### Resistance development through patient exposure

Resistance has been shown to develop in patients with aspergilloma and cavitary lung disease who have been treated with azoles.<sup>11–13</sup> Because in-vitro susceptibility testing of aspergilli is not routinely done in many clinical

*Lancet Infect Dis* 2009; 9: 789–95

Department of Medical Microbiology, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, Netherlands (P E Verweij MD, E Snelders MSc, W J G Melchers PhD); Wageningen University, Plant Science Group, Plant Research International BV, Wageningen, Netherlands (G H J Kema PhD); and Department of Mycology, National Centre of Microbiology, Carlos III Institute of Health, Madrid, Spain (E Mellado PhD)

Correspondence to: Dr Paul E Verweij, Department of Medical Microbiology, Radboud University Nijmegen Medical Centre, PO box 9101, 6500 HB Nijmegen, Netherlands p.verweij@mmb.umcn.nl



**Figure 1:** Relation between mutations and phenotypic expression in aspergillus  
 Hyphal growth, as present in invasive aspergillosis. Mutations will happen that have limited or no effect on the phenotype because they are vastly outnumbered by wild-type nuclei (A). From the hyphae, asexual propagative structures might be formed by which conidiospores (conidia) are produced via mitosis. This might happen in patients with aspergilloma. Mutations are expressed in conidia and in colonies from conidia (B). After germination of the conidia (C), hyphae and colonies with a susceptible (blue nuclei) or a resistant (brown nuclei) phenotype are formed.

microbiology laboratories, the prevalence of azole resistance is probably underestimated. Recently, Howard and colleagues<sup>11</sup> reported an increasing frequency of resistance in *A fumigatus* in predominantly azole-treated patients with aspergilloma. Pathogenesis involves infection of the patient with an azole-susceptible *A fumigatus* isolate that becomes resistant due to azole pressure. Importantly, the risk of development of phenotypic resistance seems to be dependent on the mode of reproduction of the moulds. Development of resistance might happen in patients with aspergilloma as aspergilli grow within the lung cavity by asexual reproduction through sporulation that allows multiple generations to form. This facilitates adaptation of the mould to the selective pressure of azoles.<sup>21</sup>

In patients with acute invasive aspergillosis, asexual reproduction by sporulation does not happen, and the infection progresses through hyphal elongation. Spontaneous mutations are likely to happen in nuclei within the hyphae. For example, in *Aspergillus niger*, stress (ie, high temperature or ultraviolet light) increases the mutation frequency.<sup>22</sup> Since the human body can be thought to be a hostile environment for any fungus because of exposure to host defences and antifungal drugs, mutations can be expected to happen during invasive fungal infection. However, the hyphae will contain millions of nuclei. Therefore, mutations might have little effect on the phenotype of the fungus even if the mutation results in a gain of function, primarily because the mutated genes in the pool would

be vastly outnumbered by wild-type genes (figure 1). However, mutations would be expressed in uninucleate conidia and in all colonies that develop from those conidia. Therefore, asexual reproduction seems to be essential for phenotypic expression of mutations, including those predisposing for resistance.<sup>24</sup> As a consequence, development of phenotypic resistance during treatment of patients with acute invasive aspergillosis should be seen as highly unlikely, unless the fungus undergoes asexual reproduction, for instance when the infection progresses to a cavitory lesion.

Alternative sources of patient exposure to azoles include absorption of azole residues that are present in food. Several studies have investigated the presence of azole residues in food, most notably wines, because grapes are especially vulnerable to fungal infection and azole fungicides are intensively used in vineyards. Azole residues were found in more than 75% of wines, but all concentrations were below the required maximum residue concentrations.<sup>21</sup> Although long-term exposure of consumers to azoles could happen if food contains azole residues, in general, the risk of exposure is thought to be negligible in high-income countries.<sup>24</sup> Therefore, development of resistance to medical triazoles in *A fumigatus* is unlikely to be caused by azole residues in foods.

### Resistance development through environmental exposure

Our hypothesis focuses on another route of resistance development through exposure of *A fumigatus* to azole compounds in our environment. Exposure of saprophytic fungi to azole compounds could take place in agriculture, where such compounds are commonly used for plant protection. The fungicides are applied repeatedly over a long period of time and could thereby create a persistent pressure of azole compounds on saprophytic fungi. We have previously suggested that an environmental route of resistance development in *A fumigatus* should be considered because a single mechanism of azole resistance was found in 94% of clinical isolates from different hospitals in the Netherlands.<sup>15</sup> The presence of such a dominant resistance mechanism is difficult to explain if resistance had developed exclusively through treatment of epidemiologically unrelated patients, because we would expect multiple mechanisms of resistance to develop. Substantial diversity of cytochrome P450 14- $\alpha$  sterol demethylase gene (*cyp51A*)-related resistance mechanisms was noted in the study by Howard and colleagues,<sup>11</sup> which was shown to be associated with azole therapy and suggests a different mode of resistance development than that seen in the Netherlands. Furthermore, spread of resistance is highly unlikely in invasive aspergillosis, because person-to-person transmission is very uncommon and a patient will either respond to treatment (precluding spread of the isolate) or



the treatment will fail.<sup>15</sup> In the latter case, the (resistant) fungus might survive, but its spread directly to another patient or through the environment seems highly unlikely. However, our finding of a dominant resistance mechanism could be explained by resistance development in the environment as the saprophytic growth of aspergilli enables the phenotypic expression and spread of mutations.

Furthermore, an environmental route of resistance development would be in line with the finding of primary invasive aspergillosis due to azole-resistant *A. fumigatus* in azole-naïve patients.<sup>10,14</sup> Breakthrough aspergillosis in patients on azole prophylaxis would also be consistent with an environmental route: patients would inhale both azole-susceptible and azole-resistant conidia, but the resistant conidia would have a selective advantage, thus allowing their germination in the lungs and subsequent invasive disease.<sup>10,15</sup>

### Use of azoles as pesticides

Fungicides are widely used for plant protection in the European Union. At present, slightly less than half of the total European Union acreage under cereals and grapevine are treated yearly with azole fungicides.<sup>25</sup> This compares with less than 5% of the total crop area treated yearly in the USA.<sup>25</sup> Azole fungicides, also referred to as demethylation inhibitors, inhibit the biosynthesis of fungal ergosterol by inhibition of cytochrome P450 14 $\alpha$  sterol demethylase. The most important demethylation inhibitors used in agriculture are imidazoles and triazoles. Related groups of compounds that are used to a much less extent are derivatives of piperazines, pyridines, and pyrimidines.<sup>26</sup> The mode of action of these compounds is similar to that of azoles.<sup>27</sup> However, the azoles are the only class of compounds that are used both in agriculture and in clinical medicine.

Although the overall use of pesticides in most European Union member states has declined over the past decades, the use of fungicides has remained stable in the Netherlands in recent years. However, the volume of triazole fungicides sold has almost doubled between 1995 and 2007 (figure 2). For example, the volume of azoles and azole-like agricultural fungicides that was used in the Netherlands in 2004 was about 320-times higher than that of mould-active azoles used in clinical medicine (about 130 000 kg vs 400 kg). Because plant pathogenic moulds share their natural environment with *A. fumigatus*, both are exposed to a strong and persistent pressure from azole fungicides.

### Mechanisms of azole resistance

Resistance to fungicides is well-known in agriculture and is often first recognised when expected levels of disease control are no longer achieved. Depending on the mechanism of resistance, complete failure of disease control can happen, as has been found in benzimidazole fungicides, and a more gradual loss of control, which has

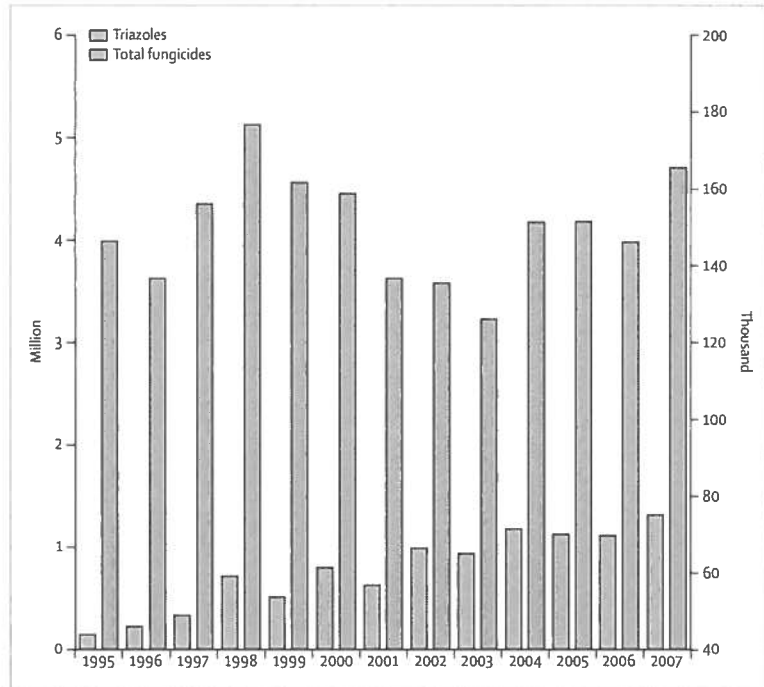


Figure 2: Total volume of fungicides and triazoles sold in the Netherlands between 1995 and 2007. Data from the Dutch Foundation for Phytofarmacy (Nefyto, Nederlandse Stichting voor Fytofarmacie).

been reported for triazoles. This failure of control corresponds with a sensitivity shift among plant pathogens towards reduced susceptibility to triazoles, which is thought to be happening in all European countries. Moreover, field isolates that develop resistance in response to exposure to a triazole commonly show a multi-azole-resistant phenotype.<sup>28</sup>

Mechanisms of azole resistance that have been described in many plant pathogens include aminoacid substitutions in the *cyp51A* gene or the presence of transcriptional enhancers, which cause overexpression of the *cyp51A* gene (table).<sup>11,12,28-44</sup> The *cyp51B* gene of *A. fumigatus* has not been shown to be a target for substitutions that are associated with resistance. The described mechanisms of fungicide resistance represent a stable, heritable trait in plant pathogenic moulds and have no apparent adverse affect on the fitness of the fungus.

In clinical *A. fumigatus* isolates, multiple aminoacid substitutions in the *cyp51A* gene have been described that correspond to azole resistance (figure 3).<sup>45</sup> Specific mutations in *cyp51A* have been associated with different susceptibility profiles in *A. fumigatus*: cross-resistance to itraconazole and posaconazole has been associated with aminoacid substitutions at glycine-54 (G54),<sup>41</sup> and a pattern of itraconazole resistance and increased minimum inhibitory concentrations for other azoles has been linked to different aminoacid substitutions at

	Azole drug resistance phenotype (Cyp51A aminoacid substitutions)*	cyp51A promoter alterations	Increased expression of Cyp51A
<i>Penicillium digitatum</i> <sup>14,23</sup>	Triflumizole, imazalil	126 bp tandem repeat (5 times)	Yes
<i>Blumeria jaapii</i> <sup>29</sup>	Fenbuconazole	Truncated non-long terminal direct repeats	Yes
<i>Uncinula necator</i> <sup>24</sup>	Triadimenol (Y136F)	..	..
<i>Erysiphe graminis</i> (formerly <i>hordei</i> ) <sup>31</sup>	Benzimidazol (Y136F)	..	..
<i>Mycosphaerella graminicola</i> <sup>33-35</sup>	Tebuconazole (I381V), difenoconazole, triadimenol (Y137F)	..	No
<i>Monilinia fructicola</i> <sup>16</sup>	Propiconazole	65 bp insertion	Yes
<i>Venturia inaequalis</i> <sup>37</sup>	Myclobutanil	553 bp insertion	Yes
<i>Blumeria graminis</i> (formerly <i>hordei</i> , <i>tritici</i> ) <sup>38</sup>	Propiconazole (K147Q), triadimenol (Y136F)	..	..
<i>Ustilago maydis</i> <sup>39</sup>	Propiconazole (G464S)	..	..
<i>Tapesia yallundae</i> <sup>40</sup>	Prochloraz, triflumizol, flusilazol, triadimenol (S35T, Q34H, N224S)	..	..
<i>Aspergillus fumigatus</i> <sup>11, 13, 41-44</sup>	Itraconazole and posaconazole (G54V, G54R, G54W, G54E); multi-azole resistant (M220V, M220T, M220I, M220K, G448S, G138C)	..	..
	Multi-azole resistant (L98H)	34 bp insertion	Yes

\*If detected.

Table: Main resistance mechanisms to azole fungicides found in plant pathogens and clinical *Aspergillus fumigatus* isolates

methionine-220 (M220).<sup>41</sup> Single mutations at codon 138, which was associated with an aminoacid substitution (G138C), and at codon 448 were also seen in a clinical *A. fumigatus* isolate that had a multi-azole-resistant phenotype.<sup>11,14,41</sup>

The dominant azole-resistant phenotype of the *A. fumigatus* isolates reported in Dutch hospitals was associated with a different resistance mechanism, which consisted of an aminoacid change in the *cyp51A* gene and the presence of a tandem repeat in the gene promoter (TR/L98H; figure 3).<sup>15,41</sup> Both alterations were shown to be necessary to display the azole-resistant phenotype, with the tandem repeat acting as a transcriptional enhancer.<sup>41</sup>

The resistance mechanism seems to be indicative of the mode of resistance development. The resistance mechanisms found in isolates thought to have become resistant through azole treatment consist of point mutations, whereas the presence of a tandem repeat is an important mechanism found in plant pathogenic moulds that develop resistance through exposure to azole fungicides (table). The insertion of a tandem repeat might happen more readily during sexual reproduction of the mould compared with asexual reproduction. Sexual reproduction was recently described in *A. fumigatus*,<sup>46</sup> but this mode of reproduction is rarely associated with fungal diseases in human beings, unlike asexual reproduction. As a consequence, the development of the 34-bp tandem repeat in *A. fumigatus* is most likely to be an event that has taken place in the environment. The second alteration found in the TR/L98H isolates, the substitution at codon 98, probably arose through a separate event.

The risk of opportunistic fungi becoming resistant because of azole antifungal use for plant protection has been acknowledged by investigators,<sup>47,48</sup> and by governmental authorities such as the Scientific Steering Committee of the Health and Consumer Protection Directorate-General of the European Commission,<sup>45</sup> but there has been little evidence to support a direct link between environmental and clinical resistant isolates. The reports were published when azole resistance in fungi was restricted to *Candida* spp, and was clearly associated with repeated azole treatment of immunocompromised patients with oropharyngeal candidiasis. Since then, a Swiss study has reported susceptibility to azoles used in clinical medicine of *A. fumigatus* isolates from compost sites, vineyards, and crop areas. Among 150 environmental isolates, 32 showed increased minimum inhibitory concentrations of azoles, but no triazole cross-resistant isolates were identified.<sup>49</sup> However, we recently reported the presence of *A. fumigatus* resistant to medical triazoles in the indoor hospital environment as well as in outdoor soil samples.<sup>50</sup> Azole-resistant isolates were never found in natural soil, only in cultivated soil samples. Furthermore, isolates resistant to medical triazoles were recovered from commercial compost and seeds obtained from a garden centre and plant nursery.<sup>50</sup> 13 of 15 (86%) environmental resistant isolates harboured the same resistance mechanism as found in clinical isolates, and genetic typing confirmed that these environmental and clinical resistant isolates were clustered.<sup>50</sup> This provides evidence that patients might become colonised and subsequently infected by resistant isolates originating from the environment.

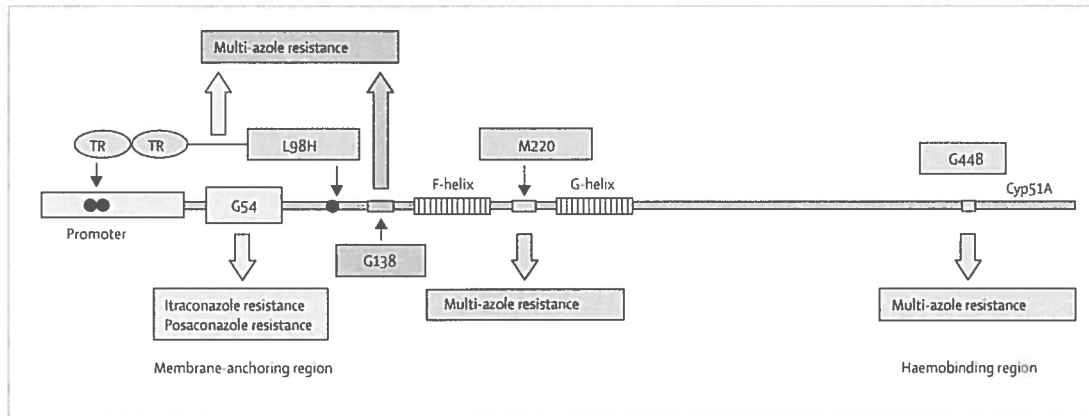


Figure 3: *Aspergillus fumigatus* cyp51A-related resistance mechanisms to azole antifungals. The position of the different mutations are shown with the associated phenotypes. MIC=minimum inhibitory concentration. TR=tandem repeat.

### A new route of antifungal drug-resistance development?

We believe that evidence is accumulating that resistance to medical triazoles might develop because of exposure of *A. fumigatus* to azole fungicides in the environment. This mode of resistance development would imply that resistance development against azole fungicides causes cross-resistance to medical triazoles. The principle has been shown for the maize pathogen *Colletotrichum graminicola*, which developed cross-resistance to itraconazole and voriconazole after exposure to the fungicide tebuconazole.<sup>51</sup> Preliminary studies with TR/L98H isolates from clinical and environmental origins indicate that these isolates are cross-resistance to tebuconazole and metconazole, again supporting a role for fungicides in resistance development.<sup>50</sup>

We seem to be at the verge of a new era in resistance development in moulds, although many questions remained unanswered. The recent emergence of azole resistance in clinical *A. fumigatus* isolates (after 1999) is difficult to explain by environmental exposure because azole fungicides have been used for several decades. A possible explanation might be that the early azole fungicides showed no activity against *A. fumigatus*, and that only recently have new compounds been introduced that have activity against *A. fumigatus*. However, the time between exposure and phenotypic resistance development is unknown, although the polyallelic nature of the TR/L98H resistance mechanism suggests a multistep development process. The dominance of the TR/L98H resistance mechanism is also unexplained because one would expect that azole exposure in the environment would result in multiple resistance mechanisms to emerge. Maybe the TR/L98H isolates have an advantage with respect to fitness compared with other mutated isolates, which would facilitate its survival and spread in the environment.

Compost might play a key part in the development and spread of azole resistance. Compost is an ecological niche

for *A. fumigatus*, and azole residues have been reported to be present in commercial compost.<sup>52</sup> Compost, which is used in domestic gardens and for indoor plants, would also provide a mode of exposure of susceptible hosts. If the environmental route of resistance development proves to be correct, we anticipate that azole resistance in *A. fumigatus* is only the first of many, with multiple yet unknown resistance mechanisms having developed in other *Aspergillus* spp and in other clinically relevant moulds.

### Future directions

To prove a relation between the use of demethylation inhibitors and resistance development in *A. fumigatus*, all azole fungicides need to be tested for activity against *A. fumigatus* isolates that are susceptible and resistant to medical triazoles, and against isolates harbouring different resistance mechanisms. The year of first field use of each fungicide will help to establish temporal relations between use of a specific fungicide and the recorded emergence of resistance in clinical isolates. For those fungicides that show cross-resistance, induction experiments should be done to establish whether resistant mutants show cross-resistance to medical triazoles. The ability of demethylation inhibitors to select the TR/L98H resistance mechanism in *A. fumigatus* would prove such a relation. This will also allow us to identify which compounds are responsible for resistance development. However, even if a relation between the use of azole fungicides and the development of resistance in *A. fumigatus* is proven, whether we can prevent further development and spread remains unclear, because resistant isolates are already present in the environment. Limiting the use of those fungicides that induce resistance might prevent the development of azole resistance, but preventing further spread of the TR/L98H resistance mechanism might not be feasible. Spread already seems to be happening, and TR/L98H has been found in other

European countries such as Norway,<sup>15</sup> the UK,<sup>13,53</sup> Belgium,<sup>54</sup> France, and Spain.<sup>54</sup> This might be the first sign of the global spread of azole resistance in aspergilli.

#### Contributors

PEV, ES, and WJGM wrote the first draft of the paper. PEV made the revisions that were reviewed by all authors. All authors contributed to the drafts and final version of the paper.

#### Conflicts of interest

PEV has received grants from Basilea, Cephalon, Gilead, Pfizer, and Schering-Plough. The other authors declare that they have no conflicts of interest.

#### References

- Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* 2009; 52: 197–205.
- Einsele H, Quabeck K, Müller KD, et al. Prediction of invasive pulmonary aspergillosis from colonisation of lower respiratory tract before marrow transplantation. *Lancet* 1998; 352: 1443.
- Sarfati J, Monod M, Recco P, et al. Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 55: 279–91.
- Patterson JE, Zidouh A, Minitier P, Andriole VT, Patterson TF. Hospital epidemiologic surveillance for invasive aspergillosis: patient demographics and the utility of antigen detection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18: 104–08.
- Keating MR, Guerrero MA, Daly RC, Walker RC, Davies SF. Transmission of invasive aspergillosis from a subclinically infected donor to three different organ transplant recipients. *Chest* 1996; 109: 1119–24.
- Pegues DA, Lasker BA, McNeil MM, et al. Cluster of cases of invasive aspergillosis in a transplant intensive care unit: evidence of person-to-person airborne transmission. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 412–16.
- Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 46: 327–60.
- Cornely OA, Maertens J, Winston DJ, et al. Posaconazole vs fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 2007; 356: 348–59.
- Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2007; 356: 335–47.
- Cowen LE. Predicting the emergence of resistance to antifungal drugs. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 204: 1–7.
- Howard SJ, Webster I, Moore CB, et al. Multi-azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Intern J Antimicrob Agents* 2006; 28: 450–53.
- Chen J, Li H, Li R, Bu D, Wan Z. Mutations in the *cyp51A* gene and susceptibility to itraconazole in *Aspergillus fumigatus* serially isolated from a patient with lung aspergilloma. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 31–37.
- Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, et al. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 834–36.
- Verweij PE, Mellado E, Melchers WJG. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 1481–83.
- Snelders E, van der Lee HAL, Kuijpers J, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med* 2008; 5: e219.
- Verweij PE, Te Dorsthorst DTA, Rijs AJMM, De Vries-Ijospers HG, Meis JFGM. 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: 2648–50.
- Warris A, Weemaes CM, Verweij PE. Multidrug resistance in *Aspergillus fumigatus*. *N Engl J Med* 2002; 347: 2173–74.
- van Leer-Buter C, Takes RP, Hebeda KM, Melchers WJ, Verweij PE. Aspergillosis—and a misleading sensitivity result. *Lancet* 2007; 370: 102.
- Hodiamont CJ, Dolman KM, ten Berge RJM, et al. Multiple-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* osteomyelitis in a patient with chronic granulomatous disease successfully treated with long-term oral posaconazole and surgery. *Med Mycol* 2009; 47: 217–20.
- Van der Linden JWM, Jansen RR, Bresters D, et al. Azole-resistant central nervous system aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1111–13.
- Anderson JB. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 547–56.
- Lamb BC, Mandaokar S, Bahsoun B, Grishkan I, Nevo E. Differences in spontaneous mutation frequencies as a function of environmental stress in soil fungi at “Evolution Canyon,” Israel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 5792–96.
- Trösken ER, Bittner N, Volkel W. Quantitation of 13 azole fungicides in wine samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2005; 1083: 113–19.
- Oestreich A, Schmid P, Schlatter C. Biological monitoring of the fungicide epoxiconazole during application. *Arch Environ Contam Toxicol* 1997; 33: 329–35.
- European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General. Opinion on azole antimycotic resistance, adopted by the Scientific Steering Committee at its meeting of 27–28 June 2002. [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/soct/02278\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/soct/02278_en.pdf) (accessed Oct 20, 2009).
- LEI. Land- en tuinbouwcijfers 2004. The Hague: LEI, 2004. [http://www.lei.dlo.nl/publicaties/PDF/2004/PR\\_xxx/PR\\_04\\_02.pdf](http://www.lei.dlo.nl/publicaties/PDF/2004/PR_xxx/PR_04_02.pdf) (accessed Nov 3, 2009).
- Ji H, Zhang W, Zhou Y, et al. A three-dimensional model of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals. *J Med Chem* 2000; 43: 2493–505.
- Hamamoto H, Hasegawa K, Nakaune R, et al. Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (*CYP51*) in *Penicillium digitatum*. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 3421–26.
- Ghosopha JM, Schmidt LS, Margosan DA, Smilanick JL. Imazalil resistance linked to a unique insertion sequence in the PdCYP51 promoter region of *Penicillium digitatum*. *Postharv Biol Technol* 2007; 44: 9–18.
- Ma Z, Proffer TJ, Jacobs JL, Sundin GW. Overexpression of the 14 $\alpha$ -demethylase target gene (*CYP51*) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 2581–85.
- Delye C, Laigret F, Corio-Costet M-F. Mutation in the 14 $\alpha$ -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 2966–70.
- Délye C, Bousset L, Corio-Costet MF. PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 $\alpha$ -demethylase (*CYP51*) gene from *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*, a “recalcitrant” fungus. *Curr Genet* 1998; 34: 399–403.
- Cools HJ, Fraaije BA, Kim SH, Lucas JA. Impact of changes in the target P450 CYP51 enzyme associated with altered triazole-sensitivity in fungal pathogens of cereal crops. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 1219–22.
- Fraaije BA, Cools HJ, Kim SH, Motteram J, Clark WS, Lucas JA. A novel substitution I381V in the sterol 14 $\alpha$ -demethylase (*Cyp51*) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. *Mol Plant Pathol* 2007; 8: 245–54.
- Leroux P, Albertini C, Gautier A, Gredt M, Walker AS. Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 $\alpha$ -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag Sci* 2007; 63: 688–98.
- Luo C, Cox KD, Amiri A, Schnabel G. Occurrence and detection of the DM1 resistance-associated genetic element ‘Mona’ in *Monilinia fructicola*. *Plant Dis* 2008; 92: 1099–103.
- Schnabel G, Jones AL. The 14 $\alpha$ -demethylase (*CYP51A1*) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathol* 2001; 91: 102–10.
- Wyand RA, Brown JK. Sequence variation in the CYP51 gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. *Fungal Genet Biol* 2005; 42: 726–35.
- Butters JA, Zhou MC, Hollomon DW. The mechanism of resistance to sterol 14 $\alpha$ -demethylation inhibitors in a mutant (Erg40) of *Ustilago maydis*. *Pest Manag Sci* 2000; 56: 257–63.
- Albertini C, Gredt M, Leroux P. Polymorphism of 14 $\alpha$ -demethylase gene (*CYP51*) in the cereal eyespot fungi *Tapesia aciformis* and *Tapesia yallundae*. *Eur J Plant Pathol* 2003; 109: 117–28.

- 41 Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A point mutation in the 14 $\alpha$ -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1120–24.
- 42 Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Substitutions at methionine 220 in the 14 $\alpha$ -sterol demethylase (*Cyp51A*) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2747–50.
- 43 Manavathu EK, Baskaran I, Krishnan S, Alangaden G, Chandrasekar PH. Cytochrome P450 14 $\alpha$ -sterol demethylase mutation dependent triazole cross-resistance in *Aspergillus fumigatus*. Proceedings of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, IL, USA; Sept 14–17, 2003. Abstract M-392.
- 44 Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1897–904.
- 45 Verweij PE, Howard SJ, Melchers WJG, Denning DW. Azole resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resist Update* 2009; published online Oct 29. DOI:10.1016/j.drug.2009.09.002.
- 46 O’Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2009; 457: 471–74.
- 47 Hof H. Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2987–90.
- 48 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 Update* 2008; 11: 25–31.
- 49 Meneau I, Sanglard D. Azole and fungicide resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med Mycol* 2005; 43 (suppl 1): S307–11.
- 50 Snelders E, Huis in ’t Veld HAG, Rijs AJMM, Kema GHJ, Melchers WJG, Verweij PE. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 4053–57.
- 51 Serfling A, Wohlrab J, Deising HB. Treatment of a clinically relevant plant-pathogenic fungus with an agricultural azole causes cross-resistance to medical azoles and potentiates caspofungin efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3672–76.
- 52 Vanni A, Fontana F, Gamberini R, Calabria A. Occurrence of dicarboximide fungicides and their metabolites’ residues in commercial compost. *Argonomie* 2004; 24: 7–12.
- 53 Howard SJ, Pasqualotto AC, Denning DW. Azole resistance in allergic bronchopulmonary aspergillosis and *Aspergillus* bronchitis. *Clin Microbiol Infect* 2009; published online Aug 7, 2009. DOI:10.1111/j.1469-0691.2009.02911.x.
- 54 Lagrou K, De Vleeschouwer J, Meerseman W, et al. Triazole resistance among 229 clinical *Aspergillus fumigatus* isolates. Proceedings of the 3rd Advances Against Aspergillosis Meeting, Miami, FL, USA; Jan 16–19, 2008. Abstract 33.



## **Azool resistentie in *Aspergillus fumigatus* in Nederland**

### **- Het totaal aantal aspergillose patiënten in Nederland**

Het totaal aantal gevallen van invasieve aspergillose in Nederland is niet goed bekend. Mijn inschatting is dat het tussen de 200 en 400 gevallen per jaar zal zijn.

### **- Percentage resistentie**

Onlangs hebben we een prospectieve surveillance onderzoek verricht in 7 academische ziekenhuizen in Nederland. Hoewel de volledige analyse nog niet is afgerond kunnen we de volgende schatting maken:

In een periode van 20 maanden (juni 2007 tot en met januari 2009) werden alle *Aspergillus* stammen die gekweekt werden van patiënten materialen in de medisch microbiologische laboratoria gescreend op de aanwezigheid van resistentie. In totaal werden 2062 ongeselecteerde *Aspergillus* isolaten onderzocht. 1792 isolaten werden geïdentificeerd als *A. fumigatus*, en de overige als andere *Aspergillus* species. Hiervan waren 82 resistent voor azolen, waarvan 2 geïdentificeerd werden als *Aspergillus niger* en 80 als *A. fumigatus*. De prevalentie van azool resistentie in *A. fumigatus* was 4,5% met een spreiding per UMC van 0,8% tot 8,5%.

De 80 azool resistente *A. fumigatus* isolaten waren afkomstig van 64 patiënten, waarvan bij 23 (36%) een *Aspergillus* ziekte werd vastgesteld. Van de 23 patiënten hadden 8 een invasieve aspergillose en 15 een niet invasieve ziekte (ABPA of aspergilloom). Een overzicht van de 8 patiënten met invasieve aspergillose staat weergegeven in onderstaande tabel.

In het vervolg van dit rapport wordt niet verder ingegaan op de consequenties van patiënten met niet-invasieve *Aspergillus* ziekten en de meerkosten van azool resistentie. Meerkosten zullen er zeker zijn in deze groep, mede omdat alternatieve geneesmiddelen duurder zijn dan de azolen en orale behandeling van deze patiënten (wat de primaire behandelingsroute is) niet mogelijk is doordat de alternatieve middelen niet oraal toegediend kunnen worden.

Age	Sex	Underlying disease	<i>Aspergillus</i> disease	Resistance mechanism	Prior treatment (duration)*	azole Treatment#	Outcome
66	M	Lung carcinoma	Proven pulmonary aspergillosis	TR/L98H	None	VCZ	Died
59	M	Hematologic malignancy, allo-SCT, GvHD	Proven pulmonary aspergillosis	TR/L98H	VCZ (>1 month)	VCZ	Died
13	F	Non-Hodgkin lymphoma	Proven pulmonary and CNS aspergillosis	TR/L98H	None	VCZ, CAS, AMB	Died
58	M	Liver transplantation for hepatic failure after methotrexate treatment for arteritis	Proven pulmonary and CNS aspergillosis	TR/L98H	None	AMB, FCZ, VCZ	Died
60	M	Acute myeloid leukemia, allo-SCT, GvHD	Proven pulmonary and CNS aspergillosis	TR/L98H	FCZ (1-2 weeks)	FCZ, VCZ, CAS, AMB, POS	Survived
54	M	Acute myeloid leukemia, relapse, allo-HSCT	Proven pulmonary aspergillosis	TR/L98H	ITZ (2-4 weeks)	VCZ	Died
50	M	Non-Hodgkin lymphoma, allo-SCT, GvHD, lungcavities	Probable pulmonary aspergillosis	TR/L98H	VCZ (>1 month)	VCZ	Died
36	F	Breast carcinoma with metastasis	Probable pulmonary aspergillosis	TR/L98H	None	VCZ	Unknown

# VCZ: voriconazol, AmB: amfotericine B, POS: posaconazol; CAS: caspofungin



Opvallende klinische observaties:

1. Bij 64% van de patiënten was er in de 3 maanden voorafgaande aan de kweek geen sprake van behandeling met azolen, wat past bij de omgeving als bron van de resistente schimmel.
2. In 92% van de stammen werd eenzelfde resistentie mechanisme aangetoond het zogenaamde TR/L98H mechanisme. Dit past ook bij besmetting vanuit de omgeving.
3. Van de 8 patiënten hebben we uitkomst gegevens van 7. Zes van de 7 patiënten (86%) is overleden. Vijf patiënten werden behandeld met voriconazol monotherapie, waarvan 4 zijn overleden. Van de vijfde patiënt is de uitkomst niet bekend. Drie patiënten zijn behandeld met andere antischimmelmiddelen na eerst met voriconazol te zijn behandeld. Twee van de 3 hiervan zijn overleden wat het gevolg zou kunnen zijn van het delay in het toedienen van een effectief middel. De verwachte respons op voriconazol behandeling in patiënten met hematologische maligniteiten was 84% in een Italiaans onderzoek [Hematologica 2010;95:644-50]. In een Nederlands onderzoek was de letaliteit van invasieve aspergillose in deze patiëntengroep 22% [Clin Infect Dis 2008;47:1507-12]. Dit suggereert dat resistentie geassocieerd is met een belangrijke toename van kans op overlijden.

Op basis van dit onderzoek kan een inschatting gemaakt worden van het aantal gevallen van azool resistente invasieve aspergillose in Nederland. Acht gevallen van azool resistente invasieve aspergillose in 20 maanden in 7 van de 8 UMCs betekent dat er per jaar 5,5 gevallen zijn die kweek positief zijn in de UMCs. Echter de kweek is positief in 30 tot 50% van de patiënten wat betekent dat het totale aantal gevallen 11 tot 18 zal zijn in de UMCs. Hoewel de UMCs de patiënten behandelen met het hoogste risico (allogene stamcel transplantatie en solide orgaantransplantatie) komen gevallen ook voor in de niet-academische ziekenhuizen. Er zijn buiten de 8 academische ziekenhuizen nog 90 ziekenhuizen in Nederland. Als we aannemen dat 50% van de gevallen van invasieve aspergillose in de academische centra voorkomt zal het totaal aantal gevallen van azool resistente aspergillose in Nederland uitkomen op 22 tot 36 per jaar.

**- Is het percentage resistentie van 6-13 % dat genoemd wordt in het artikel in The Lancet van 2009 nog steeds accuraat?**

Zie resultaat van de prospectieve surveillance studie. Er kan uitgegaan worden van een gemiddelde prevalentie van 4,5% in ongeselecteerde stammen. De hogere percentage van

13% werd gevonden in een geselecteerde populatie namelijk patiënten met een aspergillus ziekte waarbij er een reden was de gekweekte stam op te sturen naar ons centrum.

**- De extra kosten per patiënt met een resistente *Aspergillus* in vergelijking met een gewone.**

Dit is een moeilijk in te schatten. Het is duidelijk dat als resistentie niet wordt vastgesteld en patiënten worden volgens de Swab-richtlijn behandeld met voriconazol het overlijdensrisico zeer hoog is. De kosten van behandeling van patienten met invasieve aspergillose met intraveneuze toediening van voriconazol gedurende de eerste 8 dagen bedroegen €17,890 per patiënt. In deze kosten zijn verdisconteerd de kosten van diagnostiek, behandeling, verlengde opname en overig [Clin Infect Dis 2008;47:1507-12]. De mediane behandelingsduur van invasieve aspergillose was 77 dagen (van 2 tot 84) waarvan voriconazol intraveneus toegediend werd gedurende een mediane duur van 10 dagen (spreiding 2 tot 78) [N Engl J Med 2002;347:408-15]. Na intraveneuze behandeling kan overgeschakeld worden op de orale formulering van voriconazol. Als de patiënten voldoende zijn opgeknapt wordt de behandeling na ontslag gecontinueerd.

Patiënten die falen op voriconazol worden behandeld met ambisome of abelcet. De kosten per dag zijn voor deze middelen hoger dan voor voriconazol: meerkosten per dag voor ambisome €569,52 en voor abelcet €349,75. Alternatief is behandeling met een combinatie van antifungale middelen. Een combinatie van ambisome of abelcet met caspofungine ligt dan voor de hand. Meerkosten respectievelijk €951,42 of €731,65 per dag.

Voor de berekening van de totale meerkosten kan ervan worden uitgegaan dat bij azool resistentie de therapie met voriconazol na 1 week wordt omgezet in de tweedelijns therapie en dat vervolgens gedurende 70 dagen wordt behandeld. Naast de meerkosten voor de geneesmiddelen dient rekening te worden gehouden met meerkosten voor diagnostiek, voor een langere opname (waarbij rekening moet worden gehouden met een IC-opname) of eventueel het organiseren van thuis toediening van een intraveneus geneesmiddel.

## Kostenoverzicht: Antimycotica - parenteraal

stofnaam	preparaat	Per amp.	Dag dosering/ kosten
<u>amfotericine B</u>	Abelcet inf.vl. 100 mg = 20 ml	€ 150,67	350 mg € 527,35
<u>amfotericine B in liposomen</u>	Ambisome inf.poed. 50 mg	€ 186,78	200 mg € 747,12
<u>caspofungine*</u>	Cancidas inf.poed. 50 mg	€ 381,90	70/50 mg € 381,90
<u>voriconazol*</u>	Vfend inf.poed. 200 mg	€ 126,86	280 mg € 177,60

Kosten gebaseerd op Z-index taxe maart 2010 (overgenomen van Farmacotherapeutisch kompas)

\* Caspofungine en voriconazol staat op de lijst dure geneesmiddelen

Ten slotte kunnen we melden dat we in de eerste 3 maanden van 2010 een nieuw resistentie mechanisme hebben ontdekt in klinische *A. fumigatus* stammen. De stammen werden gekweekt bij 3 patiënten die in 3 verschillende ziekenhuizen in Nederland waren opgenomen. Alle 3 patiënten hadden geen eerdere blootstelling aan azolen en de stammen hadden alle eenzelfde en nieuw resistentie mechanisme. Het bijbehorende fenotype kenmerkte zich door volledige resistentie tegen voriconazol. Onze hypothese dat resistentie tegen medische azolen ontstaat door blootstelling van de schimmel aan azool fungiciden in de omgeving houdt in dat bij continuering van de azool druk nieuwe resistentie mechanismen zullen ontstaan. Nadat in 1998 de TR/L98H zich heeft gemanifesteerd in Nederland lijkt het erop dat in 2010 een tweede resistentie mechanisme in *A. fumigatus* is ontstaan.

15 juni 2010

Prof dr P.E. Verweij

Arts-microbioloog

Afdeling Medische Microbiologie

UMC St Radboud

