

STAND VAN ZAKEN

Azoolresistentie van *Aspergillus fumigatus* in Nederland

TOENAME DOOR HET GEBRUIK VAN FUNGICIDEN IN HET MILIEU?

Paul E. Verweij, Nienke van de Sande-Bruisma, Gert H.J. Kema en Willem G.J. Melchers

- De schimmel *Aspergillus fumigatus* kan resistentiemechanismen verwerven waardoor deze ongevoelig wordt voor itraconazol, voriconazol en posaconazol. In Nederland komt er een dominant resistentiemechanisme voor, dat aangeduid wordt met TR/L98H.
- De prevalentie van azoolresistentie in Nederlandse ziekenhuizen varieerde van 0,8-9,4% bij *Aspergillus fumigatus*-stammen gekweekt uit klinische materialen.
- Het TR/L98H-resistentiemechanisme ontstaat waarschijnlijk in ons milieu, waar azolen veelvuldig worden toegepast voor gewasbescherming en voor conservering van voedsel en materialen.
- Het is waarschijnlijk dat de aanwezigheid van deze stammen in het milieu leidt tot klinische infecties door inademping van deze resistente sporen. Meer onderzoek is nodig om de omgevingsroute van resistentievorming te begrijpen en om effectieve maatregelen te nemen die resistentievorming in het milieu tegengaat.
- Azoolresistentie is gerelateerd aan therapiefalen. Van 8 patiënten met azoolresistente invasieve aspergillose waren 7 binnen 12 weken overleden.
- Alternatieve behandelingsmogelijkheden zijn mogelijk toediening van de lipideformulering van amfotericine B of een combinatie van voriconazol met een echinocandine, maar er zijn nog weinig gegevens beschikbaar om deze keuzes te ondersteunen.
- Artsen die patiënten behandelen met *Aspergillus*-ziekten dienen rekening te houden met de mogelijkheid van azoolresistentie, ook bij patiënten die niet eerder azooltherapie hebben ontvangen.

Resistentievorming is een bekend probleem bij bacteriën en virussen. Bij schimmels leek dit een minder groot probleem te zijn. Zo gingen we er lange tijd vanuit dat de schimmel *Aspergillus fumigatus* intrinsiek gevoelig is voor de gebruikte antifungale middelen. Een recent surveillanceonderzoek toont echter aan dat verworven resistentie van *A. fumigatus* wijdverbreid voorkomt in Nederland. Bij deze schimmel kunnen we niet meer uitgaan van gevoeligheid voor middelen van de azoolklasse. In het tijdperk voor de antiretrovirale therapie werd resistentievorming ook bij gisten gezien bij hiv-positieve patiënten met orofaryngeale candidiasis die herhaaldelijk behandeld werden met fluconazol.¹ De gist *Candida* bleek in staat allerlei resistentiemechanismen te ontwikkelen die tot therapiefalen leidden.¹ Bij *A. fumigatus* lijkt de resistentievorming niet zozeer het gevolg te zijn van behandeling met azolen, maar eerder door blootstelling aan azoalfungiciden in het milieu.

ASPERGILLUS FUMIGATUS

A. fumigatus is een saprofytaire schimmel die algemeen in de natuur voorkomt, met name in grond en compost.

Universitair Medisch Centrum St Radboud,
afd. Medische Microbiologie, Nijmegen.

Prof.dr. P.E. Verweij, arts-microbioloog;
dr. W.J.G. Melchers, moleculair microbioloog.
RIVM, Bilthoven.

Dr. N. van de Sande-Bruisma, epidemioloog.
Wageningen Universiteit, Plant Research
International, Wageningen.

Dr. G.H.J. Kema, fytopatholoog.
Contactpersoon: prof.dr. P.E. Verweij
(p.verweij@mmb.umcn.nl).

De schimmel is in staat te groeien bij temperaturen tot 50°C en verspreidt zich gemakkelijk door middel van conidia (sporen) die zich met de lucht verplaatsen. Afhankelijk van de immunestatus van de patiënt kan *A. fumigatus* een breed scala aan ziektebeelden veroorzaken, zoals allergische beelden, aspergilloom en chronische en acute invasieve aspergillose.²

Behandeling *Aspergillus*-ziekten De azolen spelen een belangrijke rol in de preventie en behandeling van *Aspergillus*-ziekten. In gerandomiseerd onderzoek hadden patiënten met invasieve aspergillose die behandeld werden met voriconazol een betere overleving dan patiënten behandeld met amfotericine B deoxycholaat.³ Chemoprophylaxe met posaconazol was effectief om invasieve aspergillose te voorkomen bij patiënten met hematologische maligniteiten of met ernstige graft-versus-host-ziekte.^{4,5} Voor de behandeling van invasieve aspergillose wordt voriconazol als eerste keus aanbevolen en behandeling met posaconazol voor preventie van invasieve schimmelziekten bij bepaalde hoogrisicopatiëntengroepen.⁶ Itraconazol wordt toegepast bij de behandeling van niet-invasieve *Aspergillus*-ziekten zoals allergische bronchopulmonale aspergillose.⁷

De azolen zijn de enige klasse van de tegen *Aspergillus* werkzame antifungale middelen die oraal toegediend kunnen worden. Alternatieve middelen voor de behandeling van *Aspergillus*-ziekten zijn de lipideformuleringen van amfotericine B. Caspofungine heeft in-vitroactiviteit tegen *Aspergillus*-soorten, maar had een lagere effectiviteit dan voriconazol in klinisch onderzoek bij hematologische patiënten met invasieve aspergillose.^{8,9}

AZOOLRESISTENTIE

In 1998 werd voor het eerst een azoolresistente *A. fumigatus*-stam gekweekt bij een Nederlandse patiënt.¹⁰ Van 1945 tot dan toe waren alle klinische stammen en omgevingsstammen zonder uitzondering gevoelig gebleken.¹⁰ In 2007 werd een serie van 9 Nederlandse patiënten beschreven met azoolresistente invasieve aspergillose.¹¹ In een daaropvolgend epidemiologisch onderzoek van een Nijmeegse collectie van klinische *A. fumigatus*-isolaten die tussen 1994 en 2007 waren verzameld, werd azoolresistentie gevonden vanaf het jaar 2000 en werd een jaarlijkse toename van de resistentie gevonden tot een prevalentie van 6% in 2007.¹²

Recentelijk zijn de resultaten van een prospectief surveillanceonderzoek gepubliceerd waaraan 7 Nederlandse Universitair Medische Centra deelnamen.¹³ Gedurende 20 maanden (juni 2007-januari 2009) werden 2062 *Aspergillus*-stammen afkomstig van 1385 patiënten onderzocht op resistentie, waarbij 82 azoolresistente stammen werden gevonden. Azoolresistentie werd in alle

deelnemende centra gevonden, met een prevalentie variërend van 0,8-9,4% (gemiddelde: 5,3; figuur).¹³ De 82 azoolresistente stammen werden gekweekt bij 62 patiënten. Bij 23 van hen was een *Aspergillus*-ziekte vastgesteld; bij de overige 39 patiënten was er sprake van kolonisatie (aanwezigheid van de schimmel zonder dat er sprake is van een *Aspergillus*-ziekte) of van een klinisch niet relevante kweek. 15 patiënten hadden een niet-invasieve ziekte: aspergilloom (6 patiënten), allergische bronchopulmonale aspergillose bij cystische fibrose (5 patiënten), otomycose (3 patiënten) en sinusitis (1 patiënt).

Bij 8 patiënten werd 'acute invasieve aspergillose' gediagnosticeerd, bij 6 was de diagnose bewezen en bij 2 werd zij als waarschijnlijkheidsdiagnose gesteld. Bij 5 van de 8 patiënten presenteerde het ziektebeeld zich met pulmonale aspergillose. Deze patiënten werden behandeld met voriconazol, maar bij alle 5 faalde de therapie en overleden zij binnen 12 weken na de positieve kweek. De 3 andere patiënten met de diagnose 'acute invasieve aspergillose' hadden cerebrale aspergillose en werden eveneens behandeld met voriconazol, maar vervolgens ook met amfotericine B, caspofungine, posaconazol of combinaties hiervan. Van deze 3 patiënten overleden er 2. In totaal overleden dus 7 van de 8 patiënten met azoolresistente invasieve aspergillose. Dit is ongeveer 2 maal zo hoog als verwacht bij infecties door azoolgevoelige stammen (letaliteit 39-48%).¹³ Van de patiënten met een azoolresistente stam was 64% niet eerder behandeld met azolen.

RESISTENTIEMECHANISMEN

A. fumigatus kan resistent worden doordat er een puntmutatie ontstaat in het *Cyp51A*-gen. Deze mutaties veranderen waarschijnlijk de doorgankelijkheid van 2 kanalen die azolen gebruiken om de biosynthese van ergosterol, een belangrijk bestanddeel van de celmembran van de schimmel, te verstoren. Meestal zijn hierdoor alle 3 azolen, namelijk itraconazol, voriconazol en posaconazol, niet of minder werkzaam. Er is inmiddels een lange lijst van puntmutaties in het *Cyp51A*-gen die gerelateerd zijn met het optreden van resistentie.

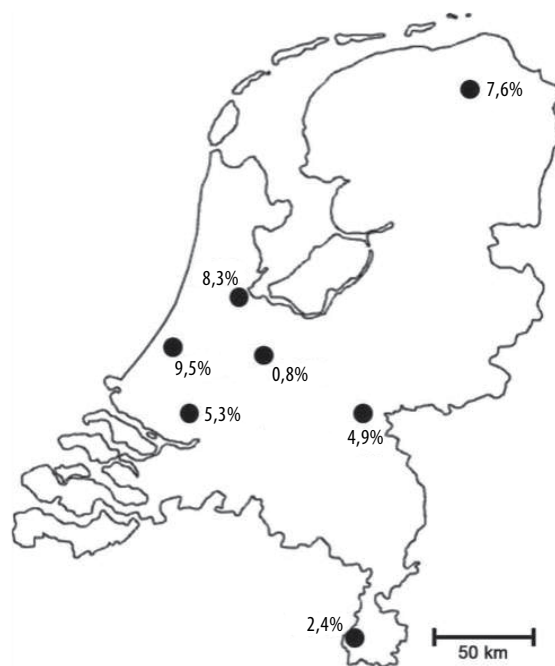
A. fumigatus kan resistent worden tijdens behandeling met azolen, maar dit is vrijwel uitsluitend beschreven bij *Aspergillus*-ziekten die gepaard gaan met holtevorming. Bij individuele patiënten kunnen mutaties in de schimmel ontstaan door azoolbehandeling, maar doordat *Aspergillus*-ziekten niet besmettelijk zijn, kunnen deze resistente stammen zich niet verder verspreiden. Deze route van resistentieontwikkeling wordt dus gekenmerkt door een grote diversiteit aan resistentiemechanismen. Onderzoek naar de resistentiemechanismen van de Nederlandse stammen toonde echter geen grote verscheidenheid van puntmutaties. Integendeel, bij meer

dan 90% van de azoolresistente stammen werd hetzelfde resistentiemechanisme gevonden. Dit bestond uit een puntmutatie in het *Cyp51A*-gen in combinatie met een tweede verandering in de promoterregio van dat gen, een zogenaamde 'tandem repeat', samen afgekort als TR/L98H. De dominantie van dit resistentiemechanisme is moeilijk te verklaren door resistentievorming als gevolg van azoolbehandeling. Zo zijn er geen aanwijzingen dat dergelijke complexere resistentiemechanismen, die bestaan uit een combinatie van genetische veranderingen, kunnen ontstaan door behandeling van patiënten. Ze worden echter wel gevonden in azoolresistente fytopathogene schimmels die resistent zijn geworden door blootstelling aan azolen in het milieu. De observatie dat bij 64% van de patiënten geen sprake was van voorafgaande blootstelling aan azolen, wijst in de richting van aanwezigheid van azoolresistente *Aspergillus* in ons milieu.

DE ROL VAN AZOOLFUNGICIDEN

Omgevingsonderzoek heeft aangetoond dat azoolresistente *Aspergillus*-stammen aanwezig zijn in het milieu, zoals in grondmonsters, water en zaden die gekocht werden bij een tuincentrum.¹⁴ Hierin werd hetzelfde TR/L98H-resistentiemechanisme aangetroffen als bij de patiëntisolaten.¹⁴ Azolen worden veelvuldig gebruikt voor gewasbescherming en voor het conserveren van voedsel en materialen tegen schimmelgroei. Gewassen zijn vatbaar voor aantasting door plantpathogene schimmels, wat grote economische schade veroorzaakt. Ook buiten de landbouw- en voedingsmiddelenindustrie worden azolen gebruikt, bijvoorbeeld in verf en badkamerverf, kit en behangplaksel. Ook leer, kleding en matrassen zijn vaak voorbehandeld met azolen.¹⁴

Om meer inzicht te krijgen in de rol van azoofungiciden bij het optreden van resistentie zijn 31 schimmeldodende middelen, die in Nederland tussen 1970 en 2005 geautoriseerd zijn voor gebruik, onderzocht op activiteit tegen *A. fumigatus*.¹⁵ Immers, *A. fumigatus* is geen plantpathogene schimmel en is geen doelorganisme van azoofungiciden. Tevens werd de molecuulstructuur van deze middelen vergeleken met die van de medische azolen. Er werden 5 azoofungiciden geïdentificeerd die qua molecuulstructuur sterke gelijkenis vertoonden met de medische triazolen.¹⁵ Deze 5 fungiciden, propiconazol, bromconazol, tebuconazol, epoxiconazol en difenoconazol, waren, evenals de medische azolen, van de triazoolklasse. Ze toonden goede in-vitroactiviteit tegen de azoolgevoelige *A. fumigatus*-stammen maar hadden geen enkele activiteit tegen de TR/L98H-stammen.¹⁵ Opvallend was dat deze 5 fungiciden geautoriseerd zijn tussen 1990 en 1996, enkele jaren voordat de eerste TR/L98H-schimmel werd gekweekt in 1998.



FIGUUR Prevalentie van azoolresistente *Aspergillus fumigatus* gekweekt uit klinische materialen in Nederlandse ziekenhuizen in de periode juni 2007-januari 2009.¹³

IMPLICATIES VAN RESISTENTIEVORMING IN HET MILIEU

We beginnen inzicht te krijgen in de gevolgen van resistentievorming in het milieu bij *A. fumigatus*. De efficiënte sporevorming maakt het mogelijk dat resistente stammen zich gemakkelijk kunnen verspreiden. In Nederland en Denemarken zijn de TR/L98H-stammen in het milieu aangetroffen,¹⁶ en recentelijk werd het TR/L98H-resistentiemechanisme ook aangetoond in klinische stammen uit Denemarken, België, Frankrijk, Italië en Oostenrijk.¹⁷ Tevens zijn deze stammen in China en India bij patiënten gevonden, wat de potentie tot mondiale verspreiding onderstreept.^{18,19} Het is waarschijnlijk dat de aanwezigheid van TR/L98H-stammen in het milieu leidt tot klinische infecties door inademing van deze resistente sporen.

Verwacht mag worden dat het niet bij de TR/L98H-mutatie blijft, aangezien het gebruik van azoofungiciden doorgaat en daarmee de blootstelling van *A. fumigatus* aan deze middelen in het milieu aanwezig blijft. Zeer recent werd inderdaad een nieuw resistentiemechanisme gevonden (aangeduid met TR₄₆/Y121F/T289A) dat zich, vergelijkbaar met TR/L98H, snel heeft verspreid in Nederlandse ziekenhuizen en eveneens in het milieu werd aangetroffen.²⁰ In 2010 steeg de prevalentie van

resistentie naar 8,3%, waarvan 2,3% werd veroorzaakt door dit nieuwe resistentiemechanisme.

Een andere implicatie is dat in principe elke patiënt met een *Aspergillus*-ziekte een azoolresistente stam kan hebben. Het Nederlandse surveillanceonderzoek heeft laten zien dat bij ongeveer tweederde van de patiënten een azoolresistente stam werd gevonden zonder voorafgaande blootstelling van de patiënt aan azolen. Er zijn op dit moment geen evidente risicofactoren voor aanwezigheid van resistentie aan te wijzen, wat het vooraf identificeren van patiënten met resistente *Aspergillus*-ziekte niet mogelijk maakt.

MAATREGELEN

In oktober 2010 heeft er onder voorzitterschap van het Centrum Infectieziektenbestrijding van het RIVM een deskundigenberaad plaatsgevonden om de medische en publieke gezondheidszorgaspecten van azoolresistentie te bespreken. Vanuit deze expertgroep werd geadviseerd om in Nederland actieve surveillance uit te gaan voeren. Per oktober 2011 is het UMC St Radboud door het ministerie van VWS aangewezen als referentielaboratorium dat in samenwerking met het Centrum Infectieziektenbestrijding surveillance zal uitvoeren. De deskundigen hebben tevens geadviseerd om de Stichting Werkgroep Antibioticabeleid (SWAB)-richtlijn 'Invasieve mycosen' te herzien ten aanzien van de behandeling van invasieve aspergillose. Daarnaast werd aanbevolen om meer onderzoek te verrichten naar de oorzaak van resistentieontwikkeling in het milieu en het probleem op te bespreken met het European Centre for Disease Prevention and Control.

Ook het bureau Risicobeoordeling en Onderzoeksprogrammering van de nieuwe Voedsel en Waren Autoriteit heeft op verzoek van de toenmalige ministeries van VWS, VROM en Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit een risicoanalyse uitgevoerd. Het advies, dat eveneens in oktober 2010 werd uitgebracht, was om meer onderzoek te verrichten naar de oorzaak van resistentievorming in het milieu. Ook adviseerde het bureau om te onderzoeken in welke mate en op welke termijn de resistentie van *A. fumigatus* afneemt als het gebruik van azoolfungiciden wordt gestaakt en vervangen door alternatieve schimmeldodende middelen. Op grond van de conclusies van zo'n onderzoek kunnen maatregelen worden genomen om de ontwikkeling van nieuwe resistentiemechanismen in Nederland gewasbescherming gehandhaafd blijft. Helaas zijn er nog geen initiatieven genomen om de oorzaak van azoolresistentie in het milieu daadwerkelijk te onderzoeken.

CONSEQUENTIES VOOR DE KLINISCHE PRAKTIJK

Uit dierexperimenteel onderzoek blijkt dat resistentie van grote invloed is op therapie succes. Bij muizen met een infectie door een *A. fumigatus*-stam met een minimaal remmende concentratie (MRC) van 16 mg/l voor posaconazol, was het middel bij alle geteste doseringen onwerkzaam. Zelfs een beperkte stijging van de MRC van 0,06 mg/l naar 0,5 mg/l resulteerde al in belangrijk verminderde overleving van de dieren.²¹ Vergelijkbare bevindingen werden gevonden met voriconazol en lijken in overeenstemming te zijn met de klinische ervaring.^{15,22}

Op basis van schattingen hebben in 2010 een kleine 60 patiënten een azoolresistente invasieve aspergillose ontwikkeld. Daarnaast zullen andere patiënten niet-invasieve *Aspergillus*-ziekten ontwikkelen met een azoolresistente stam. Gezien het brede scala van *Aspergillus*-ziektebeelden zullen veel medisch specialisten rekening moeten houden met deze nieuwe realiteit. Ook de medisch microbiologische laboratoria dienen alert te zijn op resistentie en *A. fumigatus*-stammen te testen op resistentie tegen azolen. *Aspergillus*-stammen kunnen ook opgestuurd worden naar het referentielaboratorium.

MRC's kunnen bepaald worden als *Aspergillus* gekweekt wordt. Echter, bij ongeveer 70% van de patiënten met invasieve aspergillose is de schimmelkweek negatief. Met moleculaire technieken is het mogelijk een resistentiemutatie direct in klinische monsters aan te tonen, waardoor we zelfs in kweek-negatieve patiënten kunnen vaststellen of er sprake is van azoolresistentie. Deze technieken bevinden zich echter nog in de onderzoeksfase en zijn niet algemeen beschikbaar.^{23,24}

Kennis van de lokale epidemiologie is van belang om te kunnen inschatten of de prevalentie van azoolresistentie aanpassingen noodzakelijk maakt van het antifungale behandelingsbeleid. Bij uitzondering kan soms een van de azolen nog worden ingezet, afhankelijk van de onderliggende mutatie en de MRC voor dat middel. Alternatieven voor voriconazol zijn een lipideformulering van amfotericine B of een combinatie van voriconazol met een echinocandine. Er zijn echter weinig tot geen wetenschappelijke gegevens die het gebruik van deze alternatieven bij azoolresistente aspergillose ondersteunen.

In vitro lijkt de activiteit van amfotericine B en de echinocandines tegen azoolresistente stammen gelijk aan de activiteit tegen azoolgevoelige stammen.¹² Dierexperimenteel onderzoek naar de combinatie voriconazol en anidulafungine toonde aan dat combinatietherapie synergistisch werkte bij infecties met een azoolgevoelige stam, maar slechts additief bij azoolresistente infectie.²⁵ Het is mogelijk dat bij volledige ongevoeligheid van *A. fumigatus* voor voriconazol, de effectiviteit van de com-

binatie volledig berust op de effectiviteit van anidulafungine, die suboptimaal is.²⁵ Meer onderzoek is nodig om therapiekeuzes bij azoolresistentie te onderbouwen.

Er zijn 2 patiëntcategorieën waar nu al therapeutische problemen optreden. De eerste is de groep patiënten met chronische azoolresistente *Aspergillus*-ziekten met langdurige, al dan niet ambulante behandeling voor wie geen orale alternatieven voorhanden zijn. De tweede is de groep patiënten met cerebrale aspergillose, voor wie er geen alternatieven zijn die een vergelijkbare intracerebrale concentratie bereiken als voriconazol.

CONCLUSIE

Met het ontstaan van een omgevingsroute van resistentieontwikkeling bij *A. fumigatus* is een nieuwe werkelijkheid ontstaan met belangrijke uitdagingen op het gebied van de diagnose en behandeling van patiënten met *Aspergillus*-ziekten. Het is van belang dat onderzoek wordt verricht naar de wijze waarop *A. fumigatus* resistent wordt in ons milieu, om effectieve maatregelen te kunnen nemen. Bij het uitblijven van dit onderzoek zal het probleem van azoolresistentie verder toenemen en de behandeling van patiënten met azoolresistente *Aspergillus*-ziekten verder compliceren, niet alleen in Nederland maar wereldwijd.

Het Nederlandse surveillanceonderzoek is tot stand gekomen met medewerking van drs J.W.M. van der Linden, arts-onderzoeker; drs E. Snelders, onderzoeker; dr. J. Zoll, postdoc, UMC St Radboud; dr. Y.J. Debets-Ossenkopp, arts-microbioloog, VU Medisch Centrum; dr. E.J. Kuijper, arts-microbioloog, Leids Universitair Medisch Centrum; dr. B.J.A. Rijnders, internist-infectioloog, Erasmus Medisch Centrum; dr. F.H. van Tiel, arts-microbioloog, Academisch Ziekenhuis Maastricht; E.E. Mattson, arts-microbioloog, Universitair Medisch Centrum Utrecht (huidige affiliatie: Reinier de Graaf Groep, Delft); en dr. G.A. Kampinga, arts-microbioloog, Universitair Medisch Centrum Groningen.

- De schimmel *Aspergillus fumigatus* kan resistentiemechanismen ontwikkelen waardoor deze ongevoelig wordt voor itraconazol, voriconazol en posaconazol.
- Van de *A. fumigatus*-stammen die gekweekt werden uit klinische materialen in Nederlandse ziekenhuizen was 0,8-9,4% resistent voor azolen.
- In Nederland komt er een dominant resistentiemechanisme voor, aangeduid als TR/L98H. Het ontstaat waarschijnlijk in ons milieu, waar azolen veel worden toegepast voor gewasbescherming en voor het conserveren van voedsel en materialen.
- Het is aannemelijk dat de aanwezigheid van deze stammen in het milieu leidt tot klinische infecties door inademing van deze resistente sporen.
- Azoolresistentie is gerelateerd aan therapiefalen. Van 8 patiënten met azoolresistente invasieve aspergillose waren 7 binnen 12 weken overleden.
- Alternatieven voor behandeling zijn mogelijk de lipideformulering van amfotericine B of een combinatie van voriconazol met een echinocandine, maar er zijn nog weinig gegevens beschikbaar om deze keuzes te ondersteunen.
- Ook bij patiënten met een *Aspergillus*-ziekte die niet eerder azooltherapie hebben ontvangen, dient men rekening te houden met de mogelijkheid van resistentie.

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: de afd. Medische Microbiologie van het UMC St Radboud, waar prof.dr. P.E. Verweij werkzaam is, ontving financiële bijdragen voor onderzoek van Gilead Sciences, Pfizer, MSD en Astellas.

Aanvaard op 22 april 2012

Citeer als: Ned Tijdschr Geneeskd. 2012;156:

[Meer op www.ntvg.nl/klinischepraktijk](http://www.ntvg.nl/klinischepraktijk)

LITERATUUR

- 1 Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis*. 2002;2:73-85.
- 2 Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12:310-50.
- 3 Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med*. 2002;347:408-15.
- 4 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.
- 5 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.
- 6 Oude Lashof AML, Janssen JJWM, Meis JFG, et al. Optimaliseren van het antibioticabeleid in Nederland XIII. SWAB-richtlijn voor de behandeling van invasieve schimmelinfecties. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 2009;153:A901.
- 7 Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2008;46:327-60.
- 8 Herbrecht R, Maertens J, Baila L, et al. Caspofungin first-line therapy for invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients: an European Organisation for Research and Treatment of Cancer study. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:1227-33.

- 9 Viscoli C, Herbrecht R, Akan H, et al. An EORTC Phase II study of caspofungin as first-line therapy of invasive aspergillosis in haematological patients. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:1274-81.
- 10 Verweij PE, Te Dorsthorst DT, Rijs AJ, De Vries-Hospers HG, Meis JF. Nationwide survey of in vitro activities of itraconazole and voriconazole against clinical *Aspergillus fumigatus* isolates cultured between 1945 and 1998. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2648-50.
- 11 Verweij PE, Mellado E, Melchers W. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med.* 2007;356:1481-3.
- 12 Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med.* 2008;5:e219.
- 13 van der Linden JW, Snelders E, Kampinga GA, et al. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:1846-54.
- 14 Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis.* 2009;9:789-95.
- 15 Snelders E, Camps SMT, Karawajczyk A, et al. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazole in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE.* 2012;7:e31801.
- 16 Mortensen KL, Mellado E, Lass-Flörl C, Rodriguez-Tudela JL, Johansen HK, Arendrup MC. Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:4545-9.
- 17 Van der Linden JWM, Arendrup MC, Verweij PE. Prospective international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* (SCARE-Network). 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, 2011, abstract M-490.
- 18 Lockhart SR, Frade JP, Etienne KA, Pfaller MA, Diekema DJ, Balajee SA. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance study is primarily due to the TR/L98H mutation in the *cyp51A* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:4465-8.
- 19 Chowdhary A, Kathuria S, Randhawa HS, Gaur SN, Klaassen CH, Meis JF. Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:362-6.
- 20 Verweij PE, Van der Linden JWM, Camps SMT, et al. A new resistance mechanism from environmental origin conferring to voriconazole resistance has emerged in clinical *Aspergillus fumigatus* isolates in the Netherlands. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Boston, 2010, abstract M-624.
- 21 Mavridou E, Brüggemann RJ, Melchers WJ, Mouton JW, Verweij PE. Efficacy of posaconazole against three clinical *Aspergillus fumigatus* isolates with mutations in the *cyp51A* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:860-5.
- 22 Mavridou E, Brüggemann RJ, Melchers WJ, Verweij PE, Mouton JW. Impact of *cyp51A* mutations on the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of voriconazole in a murine model of disseminated aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:4758-64.
- 23 van der Linden JW, Snelders E, Arends JP, Daenen SM, Melchers WJ, Verweij PE. Rapid diagnosis of azole-resistant aspergillosis by direct PCR using tissue specimens. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1478-80.
- 24 Denning DW, Park S, Lass-Flörl C, et al. High-frequency triazole resistance found in nonculturable *Aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease. *Clin Infect Dis.* 2011;52:1123-9.
- 25 Seyedmousavi S, Brüggemann RJM, Melchers WJG, Mouton JW, Verweij PE. Efficacy and pharmacodynamic of voriconazole combined with anidulafungin in azole resistant invasive aspergillosis. 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, 2011, abstract A2-584.