



# hmm-newsletter 4

(vom 01.03.2012)

## AZOL-RESISTENTE ASPERGILLUS SPEZIES

Emina Jukic, Sektion HMM  
[Emina.Jukic@i-med.ac.at](mailto:Emina.Jukic@i-med.ac.at)

### FACT BOX

- Weltweite Zunahme von Azol-resistentem *Aspergillus fumigatus*
- Auftreten von Multi – und Pan-Azol Resistenzen
- Klinische Korrelation mit in vitro Daten
- In Österreich seit 2010 erstmals aufgetreten (44% Itraconazolresistenz bei *Aspergillus fumigatus*)
- Einschränkung der therapeutischen Möglichkeiten

## ALLGEMEINE INFORMATION

- a) Die Gattung Aspergillus umfasst mehr als 200 Arten und gehört zu der Gruppe der Schimmelpilze. Die kennzeichnende Struktur dieser Gattung ist ein aus der Fußzelle entspringender Konidienträger (Konidiophor), der in einem Bläschen (Vesicula) endet. An diesem Bläschen findet man konidiogene Zellen (Phialiden), dort findet die Produktion der Konidien statt. Aufgrund dieses typischen Aufbaus, der einer Gießkanne ähnelt, wird dieser Pilz auch als Gießkannenschimmel bezeichnet.

Aspergillus Spezies sind Saprophyten, die ubiquitär in der Umwelt vorkommen. Man findet sie im Boden, in Blumentöpfen (abgestorbene Blätter), in Komposthaufen, in Heu oder auch auf Baustellen (Bauschutt). Nur einige Arten dieser Gattung sind humanpathogen und klinisch bedeutsam. Die häufigsten humanpathogenen Vertreter sind *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* und *Aspergillus terreus*, wobei *Aspergillus terreus* gerade im Raum Innsbruck eine bedeutende Rolle spielt. Seit 1994 konnte in Innsbruck eine zunehmende Anzahl opportunistischer Infektionen, verursacht durch *Aspergillus terreus*, beobachtet werden. Die Ursache für diesen Anstieg konnte bis jetzt nicht geklärt werden und stellt in anderen Ländern eher eine Seltenheit dar.

Durch das natürliche Vorkommen von *Aspergillus* in der Luft und in der Umwelt des Menschen kommt es zu ständigem Kontakt mit den Konidien. Diese werden entweder mit der Atemluft inhaliert oder können durch Haut- und Schleimhautverletzungen in den Körper aufgenommen werden. Für Menschen mit einem intakten Immunsystem oder intakter Oberfläche stellen die aufgenommenen Konidien keine Gefahr dar, da sie ohne Probleme vom Körper eliminiert werden können. Bei immunsupprimierten Patienten fehlt dieser Abwehrmechanismus und daher kann es zu einer Ausbreitung kommen. Eine Streuung in andere Organe ist möglich.

b) Die Krankheitsbilder sind vielfältig und reichen von Infektionen der Haut und Schleimhäute (oberflächliche Aspergillosen), Lungen-Aspergillom, Asthma bronchiale und allergische Alveolitis bis hin zu einer invasiven pulmonalen Aspergillose. Die häufigste aber auch die gefährlichste Form ist die invasive Aspergillose.

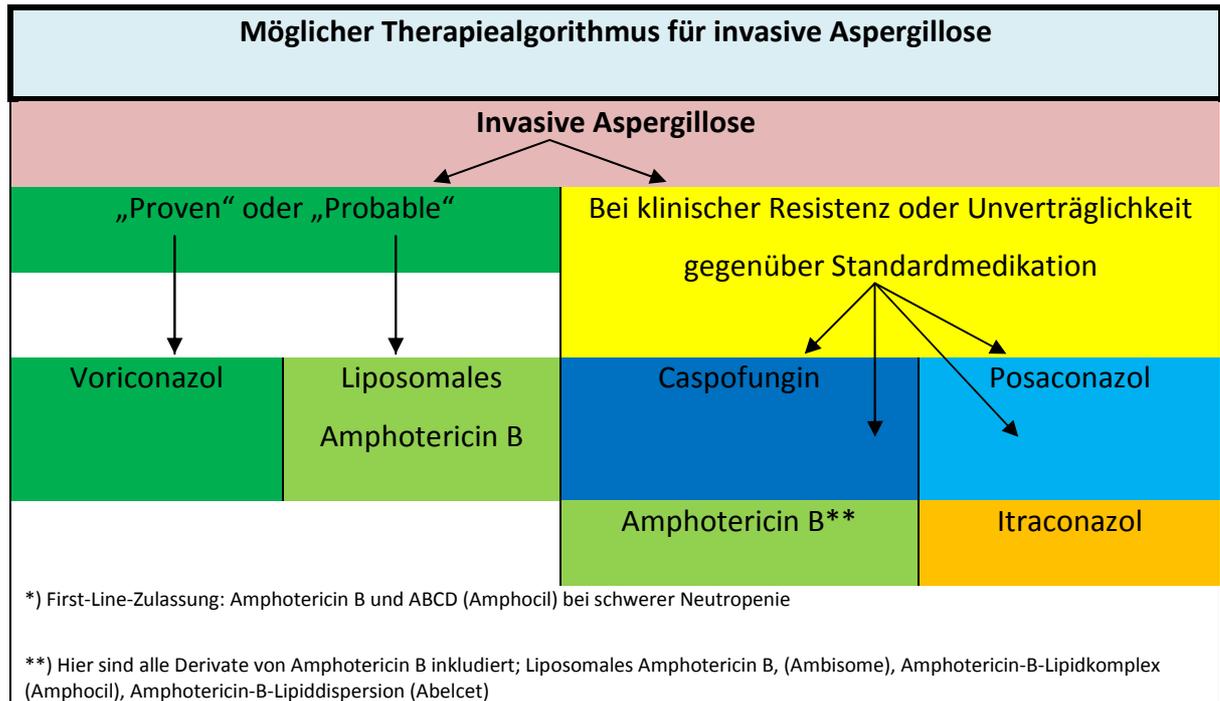
c) Diagnostik

Die Diagnostik besteht aus einer Kombination von:

- Mikroskopie
- Kultur
- Serologie
  - Antikörpernachweis: aus Blut
  - Antigennachweis: aus Blut und anderen Körperflüssigkeiten, wie z.B. Urin
- molekularbiologischen Techniken
  - PCR (z.B. aus Blut, Liquor und Bronchoalveolärer Lavage)

d) Therapie

Für die Therapie der invasiven Aspergillose ist Voriconazol heute das Mittel der ersten Wahl, nachdem in einer 2002 publizierten Studie seine Überlegenheit über Amphotericin-B-Desoxycholat gezeigt werden konnte. Liposomales Amphotericin B stellt die Alternative dar. Als weitere Substanzen bei Resistenz oder Unverträglichkeit der Firstline-Therapie kommen Amphotericin B Lipid-Präparationen, Caspofungin und weiters Posaconazol sowie Itraconazol in Frage. Eine Resistenzentwicklung von *Aspergillus* spp. gegenüber Azolen ist daher von hoher klinischer Relevanz. Das Arsenal in der Humanmedizin verwendeter wirksamer Medikamente gegen Pilzinfektionen ist äußerst begrenzt, wobei die Wirkstoffgruppe der Azole eine herausragende Stellung einnimmt.



#### a) Resistenzen

Die Empfindlichkeit von antifungalen Medikamenten wird mittels der „Minimalen Hemmkonzentration“ (MHK) ermittelt. Diese Konzentration hemmt das Wachstum oder führt zu einer sichtbare Reduktion vom Pilzwachstum.

Das Auftreten von Resistenzen bei Schimmelpilzen hatte bisher eine sehr untergeordnete Bedeutung, da de facto nicht vorhanden. In den letzten Jahren kommt es jedoch vermehrt zur Isolierung von sogenannten „Azol-resistenten Aspergillen“. Erstmalig beschrieben bei Patienten mit chronischer Aspergillose und Azol-Dauerbehandlung (> 6 Monate), werden Azol-resistente Stämme neuerdings bei Patienten mit akuter, invasiver Infektion identifiziert. Die in vitro MHK Werte korrelieren mit dem in vivo Krankheitsverlauf, die nachfolgenden therapeutischen Möglichkeiten sind sehr eingeschränkt.

Resistenzen werden eingeteilt in:

1. Primäre oder „intrinsische“ Resistenzen (gattungsabhängig)
2. Sekundäre oder „erworbene“ Resistenzen

Eine intrinsische Resistenz zeigt sich z.B. bei *Aspergillus terreus* gegenüber dem Polyen Amphotericin B. Diese Tatsache ist gerade in Innsbruck, aufgrund der erhöhten Anzahl an *Aspergillus terreus*-Infektionen von großer Bedeutung. Dennoch ist Polyenresistenz bei der Gattung *Aspergillus* extrem selten. Eine primäre Resistenz liegt z.B. auch bei Mucormyzetten und Candinen vor; diese Resistenz ist unabhängig von einer Antimykotika Exposition.

Die als „new threat/neue Seuche“ bezeichnete Azolresistenz von *Aspergillus fumigatus* steht im Mittelpunkt epidemiologischer Untersuchungen. Bis vor kurzem galt die erworbene Azolresistenz bei Aspergillen als sehr selten, dennoch wird seit 2005 eine steigende Zunahme beobachtet.

Die Gründe dafür könnten in der vermehrten Verabreichung von Azolen in der Prophylaxe als auch Therapie sein. Auf der anderen Seite werden in der Landwirtschaft zunehmend Azolverbindungen als Fungizide eingesetzt.

Drei Hypothesen werden diskutiert:

- 1. Induktion einer Azol-Resistenz der Pilzflora des Menschen durch Azol-Rückstände auf damit behandelten Pflanzen, die als "low dose" (Niedrig- oder Unterdosierung) in die Nahrungskette des Menschen gelangen.**
- 2. Selektion Azol-resistenter Pilze in der Landwirtschaft (Obst, Gemüse, Agrarprodukten) die über direkten oder indirekten Kontakt zum Menschen gelangen.**
- 3. In der Landwirtschaft gehaltene Tiere als mögliche Streuquelle resistenter Pilze.**

Eine Resistenz kann gegenüber einem Azol vorliegen oder aber mehrere Azole (Kreuzresistenz) umfassen. Betroffene Azole sind Itraconazol, Voriconazol und Posaconazol. Neben der erworbenen Azol-Resistenz gibt es auch eine intrinsische Resistenz gegenüber Azolen (Erwerb einer Resistenz ohne Azol-Exposition). Diese Isolate werden über die Umwelt aufgenommen.

### Einteilung der Azol-Resistenz bei *Aspergillus fumigatus*:

Laut EUCAST spricht man bei Schimmelpilzen von einer Azol-Resistenz, wenn die MHK bei Itraconazol > 2 µg/ml und bei Posaconazol > 0,25 µg/ml liegt. Die klinischen Breakpoints von Voriconazol für Schimmelpilze liegen noch nicht vor und sind in Bearbeitung. Nach Verweij et al. ist Voriconazol bei > 2 µg/ml als resistent zu werten.

- Pan – Azol Resistenz: Die erhöhte MHK betrifft alle Azole.
- Multi – Azol Resistenz: Die Resistenz betrifft mehr als ein Azol, aber nicht alle.
- Singuläre – Azol Resistenz: Betrifft einzeln Itraconazol, Voriconazol oder Posaconazol.

Resistenzen gegen Azole, zu denen die älteren Imidazole (Ketoconazol, Miconazol) und die neueren Triazole (Fluconazol, Itraconazol und Voriconazol) gehören, sind gegen die Lanosterol-Demethylase bei der Ergosterol-Biosynthese gerichtet. Der zugrundeliegende Mechanismus der Resistenzen ist eine Mutation im CYP15A-Gen (codiert für das Azol-Target Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase). Das Gen, welches die Lanosterol-Demethylase, den Hauptangriffsort der Azole, codiert, ist das *ERG11* Gen. Inzwischen sind sieben verschiedene Punktmutationen im *ERG11* Gen, die zu einer Azol-Resistenz von Pilzen führen können, bekannt. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die Efflux-Pumpen, codiert durch die Gene *CDR1* und *MDR1*, bei resistenten Stämmen überexprimiert sind. Das *MDR1* Gen scheint für Fluconazol spezifisch zu sein, während die *CDR* Gene bei Resistenzen gegen viele Azol-Antimykotika und damit auch bei Kreuzresistenzen gegen Azole von Bedeutung sind.

Die wichtigsten Mutationen, die im Zusammenhang mit einer Azol-Resistenz stehen, findet man am Kodon 54, 220 und 98. Mutationen im Kodon 54 zeigen oft Kreuzreaktionen zu Itraconazol und Posaconazol, wobei sich Mutationen im Kodon 220 oft in einer Multiresistenz äußern.

## 2. EPIDEMIOLOGIE

Im Jahr 2000 zeigte eine Studie in Manchester, dass 2 % von über 900 getesteten klinischen *Aspergillus fumigatus*-Isolaten eine Itraconazol-Resistenz aufweisen. Diese Zahl stieg im Jahr 2007 auf 15 %. In den Niederlanden konnte ebenso eine dramatische Zunahme der Azol-resistenten *Aspergillen* beobachtet werden. Im Jahr 2000 waren es noch 2,5 %, 2002 schon 4,9 %, 2004 6,6 % und 2009 waren es 10 % Azol-resistente *Aspergillen*. Die Kreuzresistenz für Voriconazol liegt bei 65 % und für Posaconazol bei 74 %. Die Verteilung der Azol-Resistenz zeigt eine länderspezifische Verteilung, wobei ein sporadisches Auftreten in Belgien, Dänemark, Frankreich, Schweden, Spanien und Norwegen zu sehen ist. Bis 2009 konnten in Österreich keine Azol-resistenten Stämme identifiziert werden. Erstmals werden im Jahre 2010 Azol-Resistenzen (Österreichischer Resistenzbericht, AURES 2010) beschrieben. Das Surveillance-Programm für Schimmelpilzinfektionen, welches vom AHK Wien/Institut für klinische Mikrobiologie und der Medizinischen Universität Innsbruck/Sektion für HMM durchgeführt wird, zeigt, dass 44% (11 von 25 Isolaten) der *Aspergillus fumigatus* eine Resistenz gegenüber Itraconazol aufweisen. Bei Voriconazol (1 von 96 Stämmen) und Posaconazol (1 von 108 Stämmen) konnte jeweils nur ein resistentes Isolat ermittelt werden. Kreuzresistenzen konnten nicht nachgewiesen werden; in Tirol konnten im Jahre 2011 2 Azol-resistente *Aspergillus fumigatus*-Isolate identifiziert werden. Wenngleich die lokalen Zahlen derzeit als unbedenklich eingestuft werden, ist es doch beunruhigend, dass bereits 44% Itraconazolresistenz zu verzeichnen ist. Wie sich die epidemiologische Situation in Österreich entwickelt bleibt abzuwarten. Engmaschige Kontrollen und Überwachungen sind notwendig. Die Tatsache, dass in Österreich die Intraconazol-Resistenz vorherrschend ist obwohl diese Substanz nicht in großen Mengen im klinischen Alltag eingesetzt wird, gibt zu Bedenken. Ob ein Zusammenhang mit der umfangreichen, flächenmäßigen Anwendung von Azolen im Pflanzenschutz besteht, muss geklärt werden. Fungizide werden im Pflanzenschutz zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten eingesetzt. In Deutschland wurden im Jahr 1998 insgesamt 10530 Tonnen an Fungiziden für den Inlandsbedarf abgegeben, daneben wurden 31340 Tonnen an Fungiziden exportiert. Die im Pflanzenschutz eingesetzten Azole tragen wesentlich zur Ertrags- und Qualitätssicherung der Ernte und zumindest teilweise zur Eingrenzung der Mykotoxinbelastung im Erntegut bei. Azole verfügen über das breiteste Wirkungsspektrum aller Fungizide und sind für den Integrierten

Pflanzenbau unverzichtbar. Es besteht erheblicher Bedarf an Daten über die Empfindlichkeit von humanpathogenen Pilzen im Pflanzenschutz aktuell und von "historischen" Isolaten, ebensowenig ist die Frage nach der Primär-Resistenz oder erworbenen Resistenz bei vielen Organismen geklärt. Aus infektionsepidemiologischer Sicht und unter Aspekten der Gesundheitsvorsorge ist es als problematisch anzusehen, wenn antimykotisch wirksame Substanzen, die auch zur Behandlung von Pilzinfektionen des Menschen benötigt werden, im Pflanzenschutz eingesetzt werden. Es besteht Forschungsbedarf, um das Gefährdungspotential einer möglichen Resistenzentwicklung besser einschätzen und daraus zukünftige Konsequenzen ableiten zu können.

Verfasst von: Emina Jukic, Sektion für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
Medizinische Universität Innsbruck  
Fritz-Pregl-Straße 3/3, A-6020 Innsbruck  
Email: [Emina.Jukic@i-med.ac.at](mailto:Emina.Jukic@i-med.ac.at)

### **Referenzen:**

- 1) Blum G, Perkhofer S, Grif K, Mayr A, Kropshofer G, Nachbaur D, Kafka-Ritsch R, Dierich MP, Lass-Flörl C.: A 1-year *Aspergillus terreus* surveillance study at the University Hospital of Innsbruck: molecular typing of environmental and clinical isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Dec 14.
- 2) Chandrasekar PH.: Antifungal resistance in *Aspergillus*. *Med Mycol.* 2005 May 43.
- 3) Denning DW, Park S, Lass-Flörl C, Fraczek MG, Kirwan M, Gore R, Smith J, Bueid A, Moore CB, Bowyer P, Perlin DS.: High-frequency triazole resistance found in nonculturable *Aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease. *Clin Infect Dis.* 2011 May 52.
- 4) Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM.: Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol.* 2006 Jul 55.
- 5) Geltner C., Krause R., Kulier A., Presterl E., Wenisch C., Thalhammer F., Lass-Flörl C., Antimykotische Therapie: Invasive Candidiasis und invasive Aspergillose. *Österreichische Ärztezeitung Supplementum.* 2009 Dez.
- 6) Hof H., Dörries R.: *Medizinische Mikrobiologie 2005*, 3.Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- 7) Mayr A, Lass-Flörl C.: Epidemiology and antifungal resistance in invasive Aspergillosis according to primary disease: review of the literature. *Eur J Med Res.* 2011 Apr 28.
- 8) Smith JA, Kauffman CA.: Pulmonary Fungal Infections. *Respirology.* 2012 Feb 15.
- 9) Verweij PE, Howard SJ, Melchers WJ, Denning DW.: Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resist Updat.* 2009 Dec 12.
- 10) Lass-Flörl C., Aigner M., Willinger B.: AURES Resistenzbericht für Schimmelpilze: Daten aus dem Humanbereich.