

Resistensproblemer ved behandling av invasive soppinfeksjoner

Sammendrag

Bakgrunn. Insidensen av invasive soppinfeksjoner har de siste tiårene økt parallelt med antall pasienter med immunsvikt. Til tross for flere og bedre behandlingsalternativer er resistensutvikling mot disse midlene i ferd med å bli et problem.

Materiale og metode. Grunnlagsmaterialet er fremskaffet ved søk i Medline, i tillegg er artikkelen basert på egne funn og erfaringer.

Resultater. *Candida albicans* er fremdeles den vanligste årsaken til invasive soppinfeksjoner, men *Candida* ikke-*albicans*-arter øker i forekomst. Invasive aspergillusinfeksjoner og infeksjoner med andre muggsopparter enn *Aspergillus* forekommer, men utgjør intet stort tallmessig problem. Vi har per i dag fire klasser av soppmidler til systemisk bruk, sju midler er registrert i Norge. Disse har noe forskjellige virkningsmekanismer. Primær resistens mot flere av disse midlene er observert hos mange arter av *Candida* og *Aspergillus*. Dette er den dominerende form for resistens vi observerer. Sekundær resistens som følge av behandling ses langt sjeldnere. Klinisk resistens, der behandling til tross for in vitro-følsomhet ikke fører til eradikering av mikroben, er ikke uvanlig.

Fortolkning. Forekomsten av de naturlige resistente soppartene øker noe. Hovedutfordringen i dag er å kunne identifisere den aktuelle sopp raskt og presist, slik at behandling startes på riktig indikasjon, riktig tidspunkt og med gunstigste middel.

Ingvild Nordøy
ingvild.nordoy@rikshospitalet.no
Peter Gaustad
Mikrobiologisk institutt
Rikshospitalet
0027 Oslo

Resistensproblemer er velkjent fra bakterielogien. Etter introduksjonen av antivirale midler ble det åpenbart at problemet er like aktuelt ved behandling av virusinfeksjoner. Antallet pasienter med invasive soppinfeksjoner har økt de siste årene, parallelt med en økning i antall immunkompromitterte pasienter. Individuer med svekket immunforsvar er spesielt utsatt for soppinfeksjon, og selv lavvirulente sopparter kan gi sykdom hos disse. I tillegg til en økning i antall soppinfeksjoner ser vi også en økning i antall sopparter som forårsaker infeksjon. Soppmidlene er heldigvis i denne tiden blitt flere og bedre (1), men også ved denne typen infeksjoner har mikroben utviklet mekanismer for å unngå å bli drept. Resistensutvikling mot soppmidlene er allerede blitt et klinisk problem.

Gjærsopp og muggsopp

Sopper, fungi (fungus, latin for sopp) eller eumycetes, er eukaryote organismer. De kan forårsake skade på mat og gi sykdom på planter og dyr. De kan også gi human sykdom, og per i dag er det beskrevet ca. 200 arter som kan forårsake mykoser. Mange av soppartene er naturlig forekommende i jord, vann og luft og vil derfor ofte kolonisere overflater som kommer i kontakt med disse elementene. *Candida albicans* inngår i normalfloraen hos mange friske individer.

I medisinsk mykologi deler vi soppene inn i gjærsopper og filamentøse sopper ut fra vekstegenskaper. Gjærsopper (først og fremst candidaarter og kryptokokker) er encellede mikroorganismer som danner sporer og formerer seg ved knoppkyting. Filamentøse sopper danner hyfer og vokser ved longitudinell ekstensjon og forgreninger. Formeringen skjer ved spredning av sporer. Enkelte sopparter er dimorfe – det vil si at de ved relativt lave temperaturer opptrer som filamentøse sopper, mens de ved 37 °C opptrer som gjærsopper. Gruppen omfatter soppartene *Histoplasma*, *Blastomycosis*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides* og *Penicillium*, og også immunfriske personer kan få alvorlig sykdom av disse soppartene.

*Candida*artene er de vanligst forekommende gjærsoppene. Blant de mange artene

er *C. albicans* fortsatt den vi oftest ser i laboratoriet – den er årsak til både overflatiske og invasive/systemiske infeksjoner. Filamentøse sopper kan deles inn i muggsopper og dermatofytter. Muggsopper kan gi invasiv sykdom, og det er først og fremst aspergillusarter som er humanpatogene. Det er imidlertid en økende tendens til infeksjon med andre muggsopper, bl.a. artene *Mucor*, *Rizopus*, *Rizomucor* og *Absidia*, som tilhører gruppen *Zygomycetes*. Noe stort problem tallmessig utgjør de ennå ikke, men de kan volde besvær pga. naturlig resistensforhold. *Pneumocystis* er nå klassifisert som sopp og kan gi infeksjoner hos alvorlig immunsvakte individer. Blant dermatofyter er *Trichophyton rubrum* årsak til dermatomykose i mer enn 90 % av tilfellene.

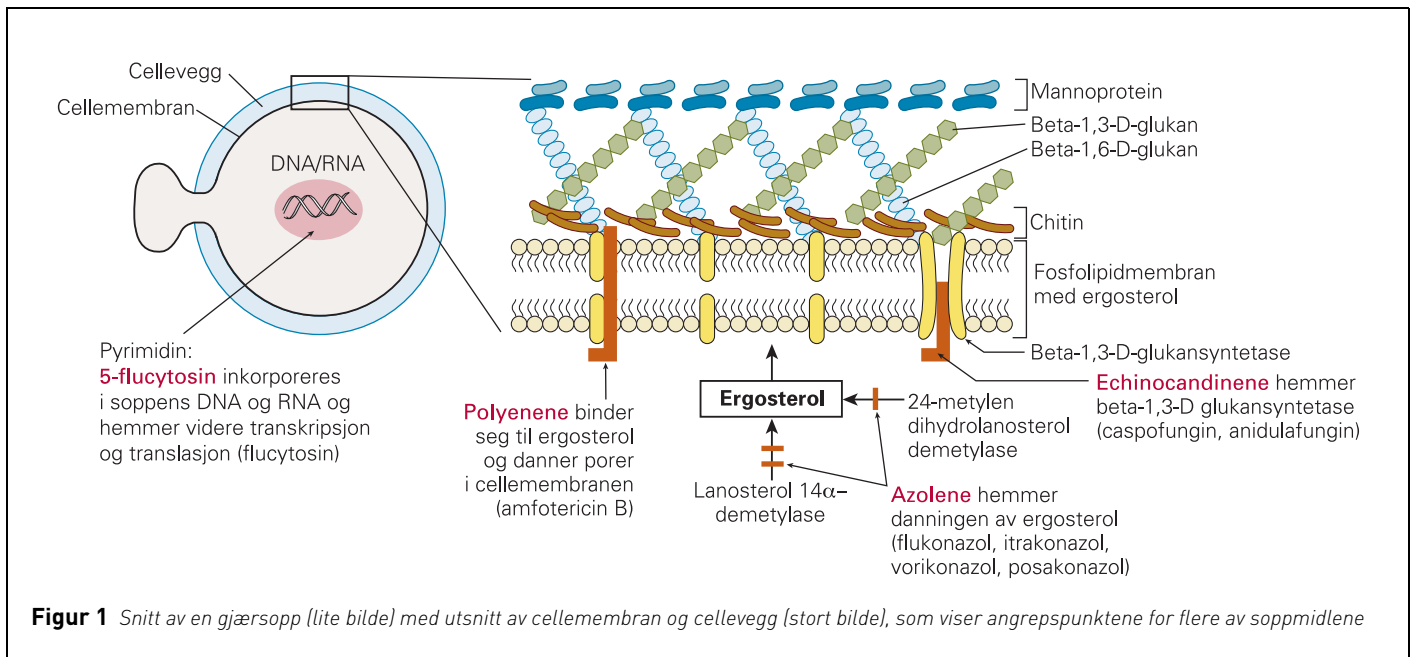
Vi deler soppene inn i primærpatogene – de som også kan gi sykdom hos immunfriske – og opportunistisk patogene – de som først og fremst gir alvorlig sykdom hos immunkompromitterte personer. I Norge er det opportunistiske infeksjoner som er årsak til invasiv sykdom (tab 1).

Hva slags sykdom kan sopp gi?

Sopp kan gi infeksjoner, de kan gi toksinbe- tingede sykdommer og de kan utløse allergi. Mest vanlig og mest kjent er sopper som gir hudinfeksjon og/eller negleinfeksjon. Disse kan være plagsomme, men er ikke livstruende. Det samme kan sies om soppinfeksjoner som rammer slimhinner i munnen og i urogenitalregionen. Andre infeksjoner er invasive, de blir systemiske og dermed potensielt livstruende, og det er i lys av denne type infeksjoner vi her vurderer behandlingsalternativer og problemet med resistensutvikling. Invasive soppinfeksjoner – definert som infeksjon i normalt sterile områder – har høy dødelighet og øker i insidens i den vestlige verden (2, 3). Spesielt har invasive

Hovedbudskap

- Invasive soppinfeksjoner hos immun-supprimerte pasienter øker i insidens, og candidaarter er fortsatt vanligst forekommende
- Naturlig resistens mot dagens soppmidler er velkjent, ervervet resistens er sjeldent
- Presis og rask diagnostikk er vesentlig for å kunne gi den beste behandlingen



aspergillusinfeksjoner en dødelighet på over 80 %.

Majoriteten av invasive soppisolater utgjøres av *Candida albicans*, *Candida* ikke-*albicans*-arter, *Pneumocystis jirovecii* og *Aspergillus fumigatus*. I Norge er insidensen av candidemi 4,9/100 000 innbyggere per år, og ca. 65,2 % av isolatene utgjøres av *C. albicans* (Nordøy, Sandven og Gaustad: upubliserte data). Tall for invasive infeksjoner med *Aspergillus* og *Pneumocystis* foreligger ikke, men forekomsten er betydelig lavere.

Diagnostikk av invasive soppinfeksjoner

Adekvat prøvemateriale er vesentlig før isolering og identifikasjon av soppen igangsettes. Mikroskopi, dyrking og histologisk undersøkelse er fortsatt gullstandarden i diagnostikken (4, 5). Gjæringsopper kan videre differensieres ved hjelp av biokjemiske analyser, mens dette hjelper oss lite ved identifikasjon av muggsopper. Antigentester – påvisning av galaktomannan, mannan og beta-D-glukan – er introdusert de siste årene og kan være til hjelp ved både gjær- og muggsopp. Nytte av disse har man først og fremst hos pasientgrupper med høy insidens av invasiv soppinfeksjon. Testene må gjentas, og den største nytten per i dag er kanskje at de har høy negativ prediktiv verdi. Nyttene av molekylærbiologiske metoder som 18S rDNA-PCR, ITS rDNA-PCR eller spesifikke PCR-analyser for identifikasjon av sopp direkte i prøvemateriale eller fra koloni er fortsatt uavklart.

Antimykotisk behandling

Antimykotiske midler interfererer med soppens stadige vedlikehold eller nydanning av cellevegg eller cellemembran (fig 1). Det er først og fremst ergosterol, som er en vesentlig komponent i soppens cellemembran, og

beta-1,3-D-glukan i celleveggen som er målet for moduleringen. Resultatet blir drap av soppen eller hemming av videre vekst (fungicid eller fungistatisk effekt).

Til behandling av systemiske soppinfeksjoner er det i Norge per i dag registrert sju medikamenter, som tilhører tre forskjellige klasser basert på virkningsmekanisme:

- Polyenet amfotericin B i forskjellig fremstilling
- Triazolene flukonazol, itraconazol, vorikonazol og posakonazol
- Echinocandinene caspofungin og anidulafungin (tab 2)

Tidligere var flucytosin registrert i Norge, men det er nå avregistrert. Det tilhører en fjerde gruppe medikamenter og er en nukleosidanalogue som interfererer med DNA- og RNA-syntesen. Midlet benyttes fortsatt på registreringsfritak ved kryptokokkmeningitt.

Til behandling av systemiske soppinfeksjoner har man i mange år kun benyttet gruppen polyener, representert ved amfotericin B. Midlet binder seg til ergosterol i cellemembranen og fører til danning av porer i denne (fig 1). Dette resulterer i celledød. Heldigvis har de fleste humanpatogene sopparter vært følsomme for dette midlet. Problemet har imidlertid vært at amfotericin B er nyretoksisk, og dette har vært den begrensende faktor i behandlingen. Da liposomalt amfotericin B ble introdusert i 1990, var det derfor et stort fremskritt. Virkningsmekanismen er uendret, men den fettholdige innpakningen gjør at liposomalt amfotericin B ikke er så toksisk.

De siste 20 årene har flere nye typer soppmidler blitt introdusert. Azolene – henholdsvis flukonazol, itraconazol, vorikonazol og nå nylig posakonazol – hemmer ergosterolsyntesen på noe forskjellig nivå i henhold til

hverandre (fig 1). Flukonazol anses som et fungicid middel overfor de candidaartene som er følsomme. De nyere azolene anses delvis å ha fungicid effekt overfor aspergillusarter.

Echinocandinene er den siste gruppen av soppmidler som er introdusert. De har helt forskjellig virkningsmekanisme enn de andre to gruppene. Celleveggen i de fleste sopparter inneholder beta-1,3-D-glukan, og echinocandinene hemmer syntesen av dette glukane (fig 1). Midlene har fungicid effekt på candidaarter og fungistatisk effekt på *Aspergillus* og dimorf sopper.

Fordi mange blir livstruende syke av invasiv soppinfeksjon, har kombinasjonsbehandling vært prøvd. Studiene er få og inkluderer ofte antatt og ikke-verifisert infeksjon. I litteraturen er det foreløpig ingen holdepunkter for at dette gir noe bedre resultat enn monoterapi (1). Ett unntak er ved kryptokokkinfeksjon, der det er dokumentert at kombinasjonen amfotericin B og flucytosin virker synergistisk. Rent teoretisk vil man kunne tenke seg nytte av en kombinasjon av midler som har forskjellig mål molekyl, f.eks. ett echinocandin pluss azol eller amfotericin B, men god dokumentasjon foreligger ikke per i dag.

Resistensutvikling mot systemiske soppmidler

Soppresistens kan deles inn i naturlig forekommende eller primær resistens (til stede før eksposisjon for antimykotika) og ervervet eller sekundær resistens (utviklet etter eksponering for antimykotika) (6, 7). En tredje type er klinisk resistens, der infeksjonen vedvarer eller progredierer på tross av bruk av riktig type antimykotika. Dette ses hos pasienter med vedvarende og alvorlige immundefekter (aids eller langvarig nøyтроpeni) og understreker nødvendigheten av et

fungerende immunsystem for å kunne bekjempe soppinfeksjoner. Det ses også i tilfeller med infisert fremmedlegeme (f.eks. sentralt venekateter), der resistensen kan være relatert til biofilmdanning. Antimykotika alene har her ofte dårlig effekt.

Resistensmekanismene hos soppene er i prinsippet de samme som dem man ser hos bakteriene. Mikroben kan endre mål molekylet, nedsette permeabiliteten i cellemembranen eller oppregulere efflukspumper. Danning av enzymer som inaktiverer medikamenter er foreløpig ikke dokumentert hos sopp.

Naturlig eller primær resistens

De hyppigste forekommende gjærsopter har forutsigbar følsomhet for de ulike antimykotika (tab 3). Korrekt identifikasjon er avgjørende for å kunne velge riktig behandling.

Amfotericin B er det midlet vi har hatt lengst, og vi vet at mange, men ikke alle *C lusitaniae*- og *C guillermonti*-isolater er naturlig resistente mot dette. For *Aspergillus*

terreus og sopper i gruppen *Zygomycetes* gjelder det samme.

Hva azolene angår, er alle *aspergillus*arter og flere candidaarter, bl.a. *C krusei*, *C norvegiensis* og *C inconspicuae*, naturlig resistente mot flukonazol. *C glabrata* er intermediert følsom eller resistent mot flukonazol, hvilket gjør at midlet ikke anbefales brukt i behandlingen av denne typen infeksjoner. De nyere azolene har et bredere spekter av indikasjoner enn flukonazol, og naturlig resistens forekommer foreløpig i mye mindre grad mot disse.

Cryptococcus spp. er naturlig resistente mot echinocandiner, ganske enkelt fordi disse soppene har lite beta-1,3-D-glukan i celleveggen. Angrepspunktet er ikke til stede.

Omtrent 10% av alle candidaarter er naturlig resistente mot flucytosin, oftest pga. en defekt i enzymet cytosindeaminase (8). Da flucytosin i monoterapi fremkaller sekundær resistens hos over 30% av candidaartene, er det klart at dette ikke har vært noe gunstig middel. Indikasjonen for å søke om registreringsfritak er kryptokokkmeningitt,

og da må midlet kun brukes i kombinasjon med amfotericin B. Primærresistens mot flucytosin er sjelden hos kryptokokker, men sekundær resistens utvikles i over 50% av tilfellene ved monoterapi (9).

I Norge forårsaker *C albicans* ca. 66% av alle candidemier, og *C albicans* er ved systemiske infeksjoner per i dag alltid følsom for fluconazol (Nordøy, Sandven og Gaustad: upubliserte data). *C glabrata* øker i insidens, og hos pasienter over 70 år utgjør de 15–20% av candidemiene. Ved så høy forekomst av *C glabrata* er det vanskelig å forsvare empirisk bruk av fluconazol i denne pasientgruppen.

Ervervet eller sekundær resistens

Dette fenomenet er først og fremst observert ved gjentatt eller langvarig behandling med flukonazol ved candidainfeksjoner (øsofagitt) hos pasienter med aids og hos beinmargstransplanterte (10, 11). Det er beskrevet tre hovedgrupper av resistensmekanismer mot azoler hos *Candida*: endring eller overekspressjon av mål molekyl, nedsatt per-

Tabell 1 Invasive opportunistiske mykoser

Sykdom	Sykdomsfremkallende sopp	Klinisk bilde
Invasiv candidiasis	<i>Candida albicans</i> eller andre candidaarter	Langvarig antibiotikaresistent feber. Lokaliserte infeksjoner i form av endoftalmitt, osteomyelitt eller hjerneabscess. Ev. forstørret lever og milt med små lesjoner på CT-skann (kronisk invasiv eller hepatosplenisk candidiasis)
Invasiv aspergillosis	<i>Aspergillus fumigatus</i> eller andre <i>aspergillus</i> arter	Langvarig antibiotikaresistent feber. En eller flere lesjoner på lungerøngten. CT-skann med karakteristisk halo og/eller «air crescent»-tegn. Fokal infeksjon
Kryptokokkose	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Meningitt hyppigst. Hematogen spredning med multiple hudlesjoner kan forekomme
Zygomycosis/mucormycosis	<i>Rhizopus</i> spp. <i>Absidia</i> spp. <i>Mucor</i> spp. <i>Rhizomucor</i> spp.	Rhinocerebral, pulmonal, gastrointestinal eller kutan mucormycosis. Disseminert form med spredning til hjerne eller andre organer kan forekomme
Pneumocystis-pneumoni	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Lungebetennelse hos aidspasienter eller andre immunsvekkede
Andre invasive infeksjoner	<i>Malassezia</i> spp. <i>Trichosporon</i> spp. <i>Fusarium</i> spp.	Kateterassosiert sepsis ved total parenteral ernæring. Disseminert sykdom hos nøytropene pasienter med positiv blodkultur og hudlesjoner. Lokaliserte infeksjoner i form av endoftalmitt, osteomyelitt eller hjerneabscess

Tabell 2 Virkningsmekanismer for soppmidler

Klasse og middel	Virkningsmekanisme	Anvendelsesområde
Virkning på cellemembranen		
<i>Polyenene</i> Amfotericin B Lipidformulering av amfotericin B	Binder seg til ergosterol i cellemembranen. Dette gir en konformasjonsendring og danning av porer i membranen som gir lekkasje og celledød	Mot gjærsopp og muggsopp. Enkelte arter er naturlig resistente: <i>A terreus</i> , <i>Scedosporium</i> sp.
<i>Azolene</i> Fluconazol Itrakonazol Vorikonazol Posakonazol	Hemmer den cytokrom P450-avhengige 14- α -demetylasen som fører til hemming av ergosterolsyntesen og opphopning av toksiske steroler i cellemembranen	Mot gjærsopp og <i>Aspergillus</i> spp. Flukonazol: <i>Aspergillus</i> spp. er resistente Vorikonazol: Effekt mot dimorfe sopp Posakonazol: Også virksom mot <i>Fusarium</i> og <i>Zygomycetes</i>
Virkning på celleveggen		
<i>Echinocandinene</i> Caspofungin Anidulafungin	Hemmer beta-1,3-D-glukansyntetase slik at beta-1,3-D-glukan ikke dannes i celleveggen. Dette kan gi osmotisk instabilitet og celledød	Mot gjærsopp og <i>Aspergillus</i>
Virkning på DNA- og RNA-syntesen		
<i>Pyrimidin</i> 5-flucytosin	Nukleosidanalog som inkorporeres i soppens DNA og RNA og hemmer videre transkripsjon og translasjon	Mot <i>Cryptococcus neoformans</i>

Tabell 3 Naturlig resistens hos enkelte gjærings- og muggsopparter. S: sensitiv, I: intermediær, R: resistent

Mikrobe	Amfoteri- cin B	Flucytosin (ikke registrert i Norge)	Flukonazol	Itrakonazol	Vorikonazol	Posakonazol	Caspofungin	Anidulafungin
<i>Candida albicans</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>C glabrata</i>	S/I	S	I/R	I/R	S/I	S	S	S
<i>C parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S	S/I ¹	S/I ¹
<i>C tropicalis</i>	S	S	S	I	S	S	S	S
<i>C krusei</i>	S	R	R	S/R	S/I	S	S	S
<i>C norvegensis</i>	S	R	R	S/R	S/I	S	S	S
<i>Cryptococcus neoformans</i>	S	S	S	I	S		R	R
<i>Aspergillus</i> spp.	S	R	R	S	S	S	S	S
<i>A terreus</i>	S/R	R	R	S	S	S	S	S
<i>Fusarium</i> spp.	S/I	R	R	R	S/I	S/R	R	R
Zygomycetes	S/R	R	R	R	R	S/R	R	R

Brytningspunkt for amfotericin B, vorikonazol, posakonazol, caspofungin, anidulafungin er ikke definert. I denne tabellen er S definert som MIC < 1 mg/l

¹ Virker fungistatisk

meabilitet i cellemembranen eller oppregulering av efflukspumper. Ofte er flere resistensmekanismer involvert samtidig (12). Ettersom flukonazol er det azolet vi har brukt lengst og hyppigst, er det grunn til å anta at liknende bruk av andre azoler vil fremkalle resistensutvikling hos *Candida*, og at det kan foreligge kryssresistens.

Kryssresistens innen gruppen av antimykotika, f.eks. hos flere av azolene, er påvist ved oppregulering av efflukspumper – de som kodes av CDR-genene (13). Andre efflukspumper er imidlertid selektive for flukonazol. I laboratoriet kan det i fremtiden bli aktuelt å gjøre undersøkelser på resistensmekanismer.

Candida med ervervet resistens mot amfotericin B er beskrevet, men det forekommer sjelden og er ikke sett i Norge (14, 15). Mekanismen er endring i eller nedsatt mengde ergosterol i cellemembranen (16).

Resistens hos candidaarter mot echinocandiner er rapportert. Mutasjoner i FSK1-genet, som koder for en subenhet av glukansyntetase, er påvist både hos *C albicans* og *C parapsilosis* (17). Det er også påvist resistente arter av *C krusei* og *C parapsilosis* uten disse mutasjonene i mål-molekylet (18). Der er foreløpig mekanismen ukjent.

Hva muggsopp angår, vet vi mye mindre om ervervet resistens fordi det mangler studier. Enkelte isolater av *A fumigatus* med in vitro-resistens mot itrakonazol er rapportert (19). En studie viste at endring i mål-molekyl og oppregulering av efflukspumper var årsak til dette (20). Kryssresistens mellom itrakonazol og posakonazol er beskrevet, samtidig som vorikonazol beholdt sin effekt. Multiple azolresistente *A fumigatus* er beskrevet i Nederland. Isolatene er resistente både mot vorikonazol, itrakonazol, ravikonazol (ikke registrert i Norge) og posakonazol (21). Dette er forårsaket av en enkel aminosyre-substitusjon i mål-molekylet samtidig med en endring i genpromotoren. Foreløpig er det ikke rapportert om *Aspergillus* som er resistente for echinocandinet caspofungin (22).

For andre muggsopper enn *Aspergillus* vet vi lite om både naturlig og ervervet resistens.

Resistensbestemmelse

Resistensbestemmelse er viktig for påvisning av naturlig og ervervet resistens og for epidemiologisk overvåking. Korrelasjon mellom behandlingssvikt og resistens overfor antimykotiske midler har imidlertid vært vanskelig å påvise – dels fordi dødeligheten har vært så høy i denne pasientgruppen. Resistensbestemmelse ved gjæringsoppinfeksjon ble for soppmidler derfor ikke standardisert før i 1997 og for muggsopp først i 2002 (23, 24). Vi har senere fått egne europeiske og nordiske brytningspunkter som nå er under revisjon (25). Fortsatt er det enkelte av de nyere soppmidlene vi ikke har brytningspunkter for.

Gullstandarden for in vitro-resistensundersøkelse av sopp er buljongfortynningsmetoden utviklet av NCCLS (nå CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute). Testen er arbeidskrevende, men har vist seg å korrelere godt med agardiffusjonsmetoder – både E-tester (AB BIODISK, Solna, Sverige) og diskdiffusjon. Det er disse som benyttes i den daglige rutinen.

Utfordringene

Per i dag er ervervet behandlingsresistent soppinfeksjon intet stort problem i Norge, men de naturlige resistente soppartene øker i hyppighet. Andre har rapportert om seleksjon av andre gjæringsopper enn *C albicans* ved langvarig empirisk eller profylaktisk bruk av flukonazol (26). Også en økende forekomst av mer behandlingsresistente sopper er rapportert som følge av profylaktisk behandling mot *Aspergillus* (27). Foreløpig har vi ikke sett dette i Norge, men det er ingen grunn til å tro at problemene ikke vil nå oss.

Hovedutfordringen nå er å diagnostisere den systemiske soppinfeksjonen raskt nok og presist nok slik at behandling kan igangsettes på riktig indikasjon, på riktig tids-

punkt og med det gunstigste midlet. Riktig identifikasjon er per i dag vel så viktig som resistensbestemmelse. Uspesifikke symptomer og funn, krav om invasive prosedyrer for å få adekvat prøvemateriale kombinert med langsomtvoksende mikrober, få gode biokjemiske markører og manglende gode genmolekylære metoder har ført til at de fleste pasienter i dag får empirisk behandling basert på klinisk mistanke om soppinfeksjon. Dette resulterer i et stort forbruk av antimykotika – med økt risiko for resistensutvikling og forekomst av behandlingsresistente sopparter.

Oppgitte interessekonflikter: Ingvild Nordøy har mottatt reisestøtte fra Swedish Orphan, Peter Gaustad har fått støtte fra MSD, Pfizer og Swedish Orphan.

Litteratur

1. Metcalf SC, Dockrell DH. Improved outcomes associated with advances in therapy for invasive fungal infections in immunocompromised hosts. *J Infect* 2007; 55: 287–99.
2. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2007; 48: 1–12.
3. Sandven P, Bevanger L, Digranes A et al. Candidem i Norge (1991 to 2003): results from a nationwide study. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1977–81.
4. Barnes RA. Early diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61 (suppl 1): i3–i6.
5. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 609–22.
6. Perea S, Patterson TF. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin Infect Dis* 2002; 25: 1073–80.
7. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 2002; 359: 1135–44.
8. Barchiesi F, Arzeni D, Caselli F et al. Primary resistance to flucytosine among clinical isolates of *Candida* spp. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 401–12.
9. Wheelan WL. The genetic basis of resistance to 5-fluorocytosine in *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Crit Rev Microbiol* 1987; 15: 45–56.
10. Sangerozan JA, Bradley SH, He X et al. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment and emergence of fluconazole resistance. *Am J Med* 1994; 97: 339–46. >>>

11. Sandven P, Bjørneklett A, Mæland A et al. Susceptibilities of Norwegian *Candida albicans* strains to fluconazole: emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2443–8.
12. Perea S, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2676–84.
13. Prasad R, de Wergifosse P, Goffeau A et al. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet* 1995; 27: 20–9.
14. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 82–402.
15. Yang YL, Ho YA, Cheng HH et al. Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 60–4.
16. Safe LM, Safe SH, Subden RE et al. Sterol content and polyene antibiotic resistance in isolates of *Candida krusei*, *Candida parakrusei*, and *Candida tropicalis*. *Can J Microbiol* 1977; 23: 398–401.
17. Balashov SV, Park S, Perlin DS. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in FKS1. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2058–63.
18. Hakki M, Staab JF, Marr KA. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2522–4.
19. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1364–8.
20. Dannaoui E, Persat F, Monier MF et al. In vitro susceptibility of *Aspergillus* spp. isolates to amphotericin B and itraconazole. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 553–5.
21. Verweij P, Mellado E, Melchers WJG. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 1481–3.
22. McCormack PL, Perry CM. Caspofungin. A review of its use in the treatment of fungal infections. *Drugs* 2005; 65: 2049–68.
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard M27-A. Villanova, PA: NCCLS, 1997.
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing in filamentous fungi; approved standard, document M38-A. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
25. NRMM. Antifungal drugs – clinical breakpoints and epidemiological cut-off values. www.srga.org/svamp/index.htm/ [10.1.2008].
26. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG et al. Increase in *C. krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med* 1991; 325: 1274–7.
27. Kontoyannis DP, Lionakis MS, Lewis RE et al. Zygomycosis in a tertiary-care center in the era of *Aspergillus*-active antifungal therapy: a case-control observational study of 27 recent cases. *J Infect Dis* 2005; 191: 1350–60.

Manuskriptet ble mottatt 23.1. 2008 og godkjent 26.6. 2008. Medisinsk redaktør Åslaug Helland.