

【原著・臨床】

臨床におけるトリコスポロン属の分離状況に関する検討

川澄 紀代¹⁾・山岸 由佳¹⁾・萩原 真生¹⁾・藤巻恵理子¹⁾・杉田 隆²⁾・三嶋 廣繁¹⁾¹⁾ 愛知医科大学病院感染制御部*²⁾ 明治薬科大学微生物学教室

(平成23年1月11日受付・平成23年11月21日受理)

トリコスポロン属は、土壤中に分布する環境真菌で、日和見感染症の原因菌として重要であるが、偏重な抗真菌薬の使用によるブレイクスルー感染症としても重要である。今回、ミカファンギン(MCFG)使用量とトリコスポロン属の検出数との関連について調査を行った。2003年から2009年までの間に、愛知医科大学病院でトリコスポロン属が検出された62名81検体を対象に、患者背景、検出状況を検討した。また、同期間における抗真菌薬の使用本数および使用比率を調査し、トリコスポロン属の検出状況との関連性について検討した。関連性の統計学的解析は、Spearmanの順位相関係数を用い、Spearmanの順位相関係数 $rs > 0.786$ を有意差あり($p < 0.05$)とした。検出検体は尿が最も多く、次いで痰、糞便であった。8種のプライマーを用いたRandom Amplified Polymorphic DNA解析では、医療関連感染も示唆される症例を認めた。各年におけるトリコスポロン属の検出患者数とMCFGの使用本数および使用比率との順位相関係数は、0.811($p = 0.03$)および0.613($p = 0.14$)であった。トリコスポロン属の検出数とMCFGの使用本数には、統計学的に有意な関連性($p < 0.05$)が認められ、相対的使用量より絶対的使用量において関連性が高いことが示唆された。MCFGは、深在性真菌症の予防および治療として広く使用されており、抗真菌薬の偏重な使用は、真菌のブレイクスルー感染症を引き起こすことが知られていることから、病院全体で抗真菌薬の絶対的使用量への配慮も必要であると考えられる。

Key words: *Trichosporon*, antifungal agent, prevalence

トリコスポロン属は酵母様真菌の一種で、自然界では広く土壌や腐敗樹木などに存在し、ヒトの皮膚や気道に一時的に保菌したり、消化管の細菌叢に恒久的に定着することもある。日本では家屋に発生したトリコスポロンを吸入することで起こる夏型過敏性肺炎の原因抗原としても知られている¹⁾。近年では、易感染性宿主における深在性トリコスポロン症の発症の報告が増加しており、致死率が80~90%と予後不良であることが知られている²⁾。その疫学は、深在性真菌血症の原因真菌では、酵母様真菌においてカンジダ属に次いで2番目に多い³⁾とされるが、日本における頻度は、1%未満⁴⁾から8%前後⁵⁾と幅があり、診断の難しさを反映していると推察される。また、検出率は患者背景や抗真菌薬の使用状況に影響されるとも考えられている⁶⁾。

トリコスポロン症は、キャンディン系抗真菌薬の使用中に発症するブレイクスルー感染症としても注目されている。キャンディン系抗真菌薬は、真菌細胞壁の構成成分である1,3-β-D-グルカンの合成酵素を分子標的としており、真菌細胞壁の生合成を特異的に阻害する薬剤であるが、深在性真菌症の主要な原因真菌であるカンジダ属、アスペルギルス属に優れた抗真菌活性を示す^{7,8)}。一方で、トリコスポロン属やクリ

プトコックス属に対しては、活性をもたず²⁸⁾、国内外で、ブレイクスルー感染症の報告がみられている⁹⁻¹⁵⁾。

トリコスポロン症は、消化管からの内因性感染によって発症すると考えられているが、また一方で、中心静脈カテーテルや末梢静脈カテーテルを長期留置された症例が多く¹⁶⁾、外因性感染の可能性も否めない。Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)解析により、院内伝播を示唆する報告^{17,18)}もあり、院内感染の可能性も注目されている。

愛知医科大学病院(以下、当院)の各種培養検査において、2005年と2008年に例年より多いトリコスポロン属の検出がみられたことから分離背景について調査を行った。また、トリコスポロン属検出数と抗真菌薬の院内使用状況との関係性に着目し、特にミカファンギン(MCFG)使用量との関連について検討したので報告する。

I. 対象と方法

2003年1月から2009年12月までに当院でトリコスポロン属が分離された63名のうち、新生児1名を除いた62名81検体を対象とし、診療録および検査記録から後方視的に調査した。トリコスポロン属の検出状況に関しては、検体種別症例数および持続検出の有無を調査項目

*愛知県長久手市岩作雁又1-1

Table 1. Number of cases according to specimen material

	<i>Trichosporon asahii</i>	<i>Trichosporon</i> spp.	Total
Urine	34	1	35 (55.6%)
Stool	13	0	13 (20.6%)
Sputum	8	0	8 (12.7%)
Pus	1	1	2 (3.2%)
Blood	1	0	1 (1.6%)
Ascites	1	0	1 (1.6%)
Skin	1	0	1 (1.6%)
Two or more analytes (Pus from pleural drain site & Sputum) (Throat swab & Sputum)	2	0	2 (3.2%)
Total	61 (96.8%)	2 (3.2%)	63

Table 2. Background of the patients from whom *Trichosporon* species were isolated

Gender	Male/Female	42/21 (66.7%/33.3%)
Age	Mean \pm SD	68.1 \pm 16.4 [4-89]
Detection frequency	Once/Continuous/Re-detection	56/6/1 (88.9%/9.5%/1.6%)
Antibacterial agents used within 30 days	Yes/No	54/9 (85.7%/14.3%)
Antifungal agents used within 30 days	Yes/No	16/47 (25.4%/74.6%)

とした。検出が1回のみまたは検出後30日以内に同一部位から再検出が認められなかった症例を単回検出例、同一患者から30日以内に複数回の検出が認められた場合は、1症例とし、それが同一検体からの検出であった場合は持続例とした。また、30日以上経過してから再検出をみた場合は、再検出例とした。なお、各症例におけるトリコスポロンの定着、感染症（疑いを含む）の有無にかかわらず、純粋にトリコスポロンが検出された症例のみを検討した。患者背景として、性別、年齢、基礎疾患、検出30日以内における抗真菌薬前投与の有無、検出30日以内における抗菌薬投与の有無、入院期間中における転帰を調査した。

また、同期間におけるMCFGの使用本数および抗真菌薬に占めるMCFGの使用比率を調査し、トリコスポロン属検出症例数との関連性について検討した。関連性の統計学的解析は、Spearmanの順位相関係数を用い、 $n=7$ において、Spearmanの順位相関係数 $rs>0.786$ を有意差あり($p<0.05$)とした。トリコスポロン属の同定には、API20Cオキサノグラム(SYSMEX bioMerieux Co., Ltd.)を使用した。また、2008年5月から2009年7月の検出検体のうち18検体について、RAPD解析を行った。RAPD解析には、R28-1, R28-2, M13, A1, A2, 6, OPE-1, RC8の8種のプライマーを用いた。

II. 結 果

1. 検出部位と検出状況

調査対象となった63例(62名)の菌種の内訳は、*Trichosporon asahii* 61例(96.8%)、その他の*Trichosporon*属2例(3.2%)であった。検出部位は、尿が35例(55.6%)

と最多で、次いで糞便13例(20.6%)、喀痰8例(12.7%)、膿2例(3.2%)、血液1例(1.6%)、腹水1例(1.6%)、皮膚1例(1.6%)、複数箇所からの検出が2例(3.2%)であった。複数箇所からの検出部位はそれぞれ、膿(胸腔ドレナージ)と喀痰が1例、咽頭擦過と喀痰が1例であった(Table 1)。単回検出例は56例(88.9%)、持続検出例は6例(9.5%)、再検出例は1例(1.6%)であった(Table 2)。

2. 患者背景

患者背景をTable 2に示す。性別は、男性42例(66.7%)、女性21例(33.3%)と、男性に多い傾向がみられた。63例の年齢は 68.1 ± 16.4 歳(4~89歳)であった(Table 2)。基礎疾患は、固形腫瘍11例(17.5%)、造血器腫瘍11例(17.5%)、腎疾患10例(15.9%)、脳血管障害8例(12.7%)、糖尿病7例(11.1%)、自己免疫疾患4例(6.3%)、良性呼吸器疾患2例(3.2%)、熱傷2例(3.2%)、その他8例(12.7%)であった(Fig. 1)。

患者転帰は、単回検出例に比べ、持続検出例において死亡率が高い傾向があった(Table 3)。

検出前30日以内の抗菌薬の使用歴は54例(85.7%)、30日以内の抗真菌薬の使用歴は、16例(25.4%)であった(Table 2)。投与されていた抗真菌薬の内訳をTable 4に示す。注射用抗真菌薬は、深在性カンジダ症の標的治療、経験的治療、予防投与に対し投与されていた。経口抗真菌薬使用例は、血液内科・小児科領域での予防投与であった。

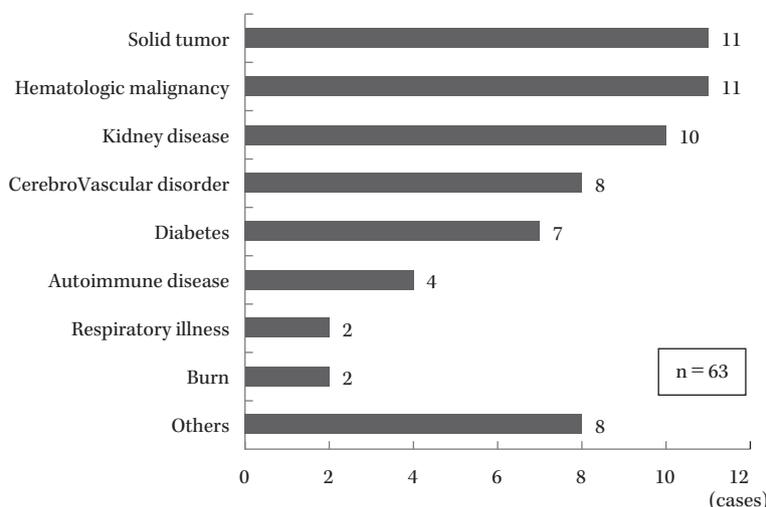


Fig. 1. Underlying diseases of the patients from whom *Trichosporon* species were isolated.

Table 3. Clinical outcomes of the patients from whom *Trichosporon* species were isolated

Detection frequency	Gross result	Number of cases
Once (56 cases)	Survived/Died	38 (67.9%)/18 (32.1%)
Continuous (6 cases)	Survived/Died	3 (50.0%)/ 3 (50.0%)
Re-detection (1 case)	Survived/Died	1 (100%)/ 0 (0%)

Table 4. Clinical situation of antifungal therapy in the patients from whom *Trichosporon* species were isolated

Antifungal agents used and number of cases	Presence of concomitant antifungal agent	Antifungal agent use days until detecting (mean \pm S.D.)
MCFG 11	Single agent	19.2 \pm 15.6
	FLCZ (p.o.)	
	ITCZ (p.o.)	
	AMPH-B (p.o.)	
F-FLCZ 4	Single agent	19.8 \pm 26.9
L-AMB (Change from MCFG) 1	Single agent	1
FLCZ (p.o.) 2	Single agent	More than 30 days
	MCFG	
ITCZ (p.o.) 2	MCFG	More than 30 days
AMPH-B (p.o.) 1	MCFG	33

MCFG; micafungin, F-FLCZ; fosfluconazole, ITCZ: itraconazole, AMPH-B; amphotericin B, p.o.: per os, S.D.; standard deviation

3. トリコスポロン属の検出症例数の推移と抗真菌薬使用量推移

2003年から2009年までのトリコスポロン属の検出症例数の推移をFig. 2に示す。検出症例数は、2005年に18症例、2008年に14症例と例年より多く検出された。また、同期間の当院における各種抗真菌薬の使用量推移および全抗真菌薬使用量に占めるMCFGの割合の推移をFig. 3に示す。MCFGの年間使用本数は、2003年に2,256

本、その後2005年の2,515本をピークに微減したが、2008年は3,455本と増加した。また、MCFGの占める割合は、採用直後の2003年には48%を占め、その後、ホスフルコナゾール、ボリコナゾール、リボソーマルアムホテリシンB、イトラコナゾールと次々に新しい薬剤が採用されるにつれて、2005年の57%をピークに減少し、2008年は44%であった。

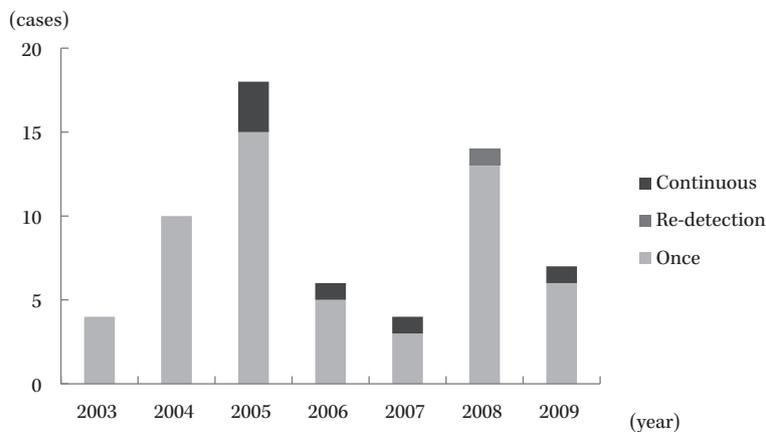


Fig. 2. Number of cases which *Trichosporon* species were isolated.

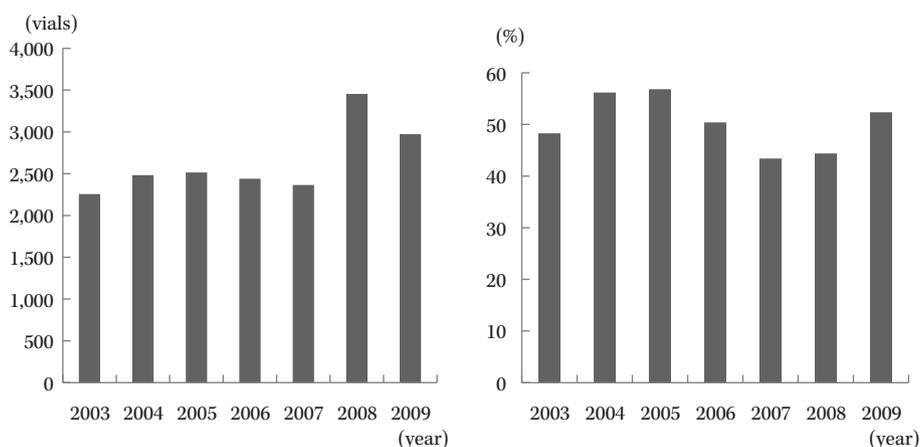


Fig. 3. Annual change of micafungin consumption in Aichi Medical University Hospital.

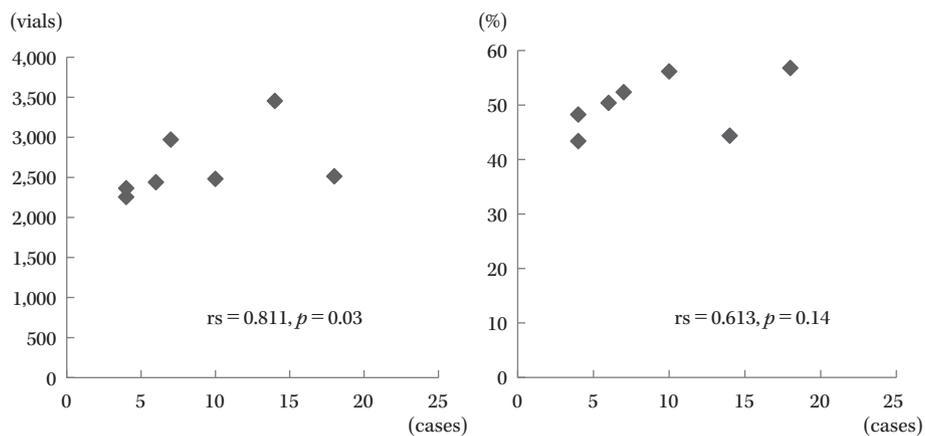


Fig. 4. Rank correlation between the number of *Trichosporon* species isolation cases and the amount of micafungin consumption.

4. トリコスポロン属検出症例数と MCFG 使用本数および使用比率との順位相関

Fig. 4 に散布図および相関係数を示す。各年における検出症例数と MCFG の使用本数および使用比率との順位相関係数は、0.811 ($p=0.03$) および 0.613 ($p=0.14$) で

あり、検出症例数と MCFG 使用本数との間には、統計学的有意性 ($rs>0.786$, $p<0.05$) が認められた。

5. RAPD 解析

解析結果を Table 5 に示す。RAPD 解析を行った 18 検体は、A から D の 4 つのグループに分類された。グ

Table 5. Groups separated by RAPD analysis

Specimen number	Patient number	Ward	Isolation date	Gender	Site	Groups separated by RAPD Primer								Group
						R28-1	R28-2	M13	A1	A2	6	OPE-1	RC8	
1	1	8A	2008/5/21	Male	Feces	1	1	1	1	1	1	1	1	A
2	2	8C	2008/7/2	Male	Urine	1	1	1	1	1	1	1	1	
5	5	8C	2008/9/10	Male	Urine	1	1	1	1	1	1	1	1	
7	2	8C	2008/10/3	Male	Urine	1	1	1	1	1	1	1	1	
12	9	7D	2009/3/18	Male	Blood	1	1	1	1	1	1	1	1	
13	10	ICU	2009/3/27	Male	Sputum	1	1	1	1	1	1	1	1	
6	4	8D	2008/9/17	Male	Sputum	1	1	1	3	1	1	1	2	B
4	4	8D	2008/9/11	Male	Sputum	1	1	1	3	1	1	1	3	C
10	7	5A	2009/1/14	Male	Urine	1	1	1	3	1	1	1	3	
11	8	7C	2009/2/6	Female	Urine	1	1	1	3	1	1	1	3	
14	11	ICU	2009/6/16	Male	Urine	1	1	1	3	1	1	1	3	
15	11	5C	2009/6/22	Male	Urine	1	1	1	3	1	1	1	3	
16	11	5C	2009/6/24	Male	Urine	1	1	1	3	1	1	1	3	
17	11	5C	2009/6/26	Male	Urine	1	1	1	3	1	1	1	3	
18	11	5C	2009/7/4	Male	Urine	1	1	1	3	1	1	1	3	
3	3	10B	2008/8/23	Female	Feces	2	1	1	2	1	1	1	2	D
8	6	9A	2008/10/30	Male	Pharynx	2	1	1	2	1	1	1	2	
9	6	9A	2008/10/31	Male	Sputum	2	1	1	2	1	1	1	2	

RAPD: Random amplified polymorphic DNA

グループ A に分類された検体番号 1, 2, 5, 7, 12, 13 の 6 検体は、同等性が高かった。検体番号 2 と 7 は同一患者 (patient 2) であるが、検体番号 2 での検出の後、検体番号 7 までの間に、5 回の尿培養が行われており、すべて陰性であった。グループ C に分類された検体番号 14 から 18 は、同一患者由来であり、遺伝子パターンも同一であった。

III. 考 察

トリコスポロン属は、カンジダ属やアスペルギルス属に比べ病原性は低いとされている¹⁹⁾が、近年、深在性トリコスポロン症が注目される背景には、医療の進歩により、抗がん薬治療や移植治療中の免疫力が低下した患者や医療器具を使用する患者の増加に伴い、易感染性宿主の深在性トリコスポロン症の報告^{2, 20, 21)}が増加していること、いったん発症した場合の致死率がきわめて高いこと²⁾などが挙げられる。新たなリスク因子として、トリコスポロン属に感受性をもたないキャンディン系抗真菌薬^{9, 10)}や、アゾール系抗真菌薬^{11, 12)}の長期使用が報告されている。

トリコスポロン属は、幅広くさまざまな患者から検出されるが、その多くは単回検出の通過菌であると推測される。しかしながら、持続検出例においては、死亡症例で検出期間が長期になる傾向がみられた。Haupt らは、易感染性宿主の 3.7% が、糞便、皮膚、尿などの何らかの検体において陽性であり、尿培養で繰り返しトリコスポロンが検出される場合には、トリコスポロン発症につながる可能性を示唆している²²⁾。日本においては、2002 年より MCFG の使用が可能となり、トリコスポロン症のブレイクスルー感染症の報告が増加している^{9-11, 15)}。Suzuki

らは、1992 年から 2007 年までの 16 年間にみられた血液癌患者におけるトリコスポロン症 33 例のうちの 18 例が MCFG のブレイクスルーであったと報告しており¹⁵⁾、MCFG の登場以降、トリコスポロン症の発症が増加していることがうかがえる。また、病理剖検例から見た疫学調査においても、トリコスポロン症は増加傾向にあると考えられている²³⁾。しかしながら、MCFG 投与患者に占めるブレイクスルー感染症の発症頻度は非常に低く、発症症例の報告においても使用量や投与期間はさまざま、MCFG 使用量とトリコスポロン症の発症率あるいは検出率との関連性については明確にされていない。今回、われわれの研究では、MCFG の使用本数とトリコスポロン属の検出症例数との間に、正の相関性を認めた。MCFG 使用量の増加は、自然耐性であるトリコスポロン属に対して、発症以前の保菌状況にも影響を与えている可能性が示唆されたが、今後、より広い疫学調査によって検証されるべきと考えられる。

また、院内伝播の観点からは、尿培養でトリコスポロンが陽性であった患者において尿路カテーテルを抜去した直後の無菌室および廊下の空気中からトリコスポロンが検出され、RAPD 解析により、同一パターンを示したとの報告¹⁴⁾があり、医療器具の取扱いが環境に与える影響も否めない。本研究では、RAPD 解析を行った検体のうち、patient 2 から 2 度の検出 (検体番号 2, 7) が認められたが、尿路感染症ではなかった。同一症例から 2 度の検出が認められたことが、尿以外の部位での保菌によるものか、新たな検出かは明確ではないが、同一期間に同一病棟の patient 5 (検体番号 5) から同等性の高い菌株が検出されたことから、院内伝播の可能性も考えられ

た。

MCFG は、深在性真菌症の予防および治療として広く使用されている。抗真菌薬の偏重な使用は、真菌のブレイクスルー感染症を引き起こす可能性があり、病院ごとに、病院全体の抗真菌薬の絶対的使用量を把握することは意義があると考えられる。

本論文は、第2回日本化学療法学会西日本支部長賞受賞の対象となった研究内容に関する論文である。

なお、本論文に関する利益相反はない。

文 献

- 1) Shimazu K, Ando M, Sakata T, Yoshida K, Araki S: Hypersensitivity pneumonitis induced by *Trichosporon cutaneum*. *Am Rev Resp Dis* 1984; 130: 407-11
- 2) Tashiro T, Nagai H, Kamberi P, Goto Y, Kikuchi H, Nasu M, et al: Disseminated *Trichosporon beigeli* infection in patients with malignant diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 218-24
- 3) Chagas-Neto T C, Chaves G M, Colombo A L: Update on the genus *Trichosporon*. *Mycopathologia* 2008; 166: 121-32
- 4) 久米 光, 山崎敏和, 阿部美知子, 田沼弘之, 奥平雅彦, 岡安 勲: 白血病(MDSを含む)剖検例における内臓真菌症の疫学。日本医真菌学会雑誌 2006; 47: 15-24
- 5) 山上由理子: 真菌症の診断, トリコスポロン・ムーコル症。日本臨床微生物学雑誌 1998; 8: 136-41
- 6) 時松一成, 門田淳一: 新興深在性真菌症—トリコスポロン症の臨床—。感染症学雑誌 2006; 80: 196-202
- 7) 小林寅喆, 鈴木真言, 雑賀 威, 池田文昭, 堀 康宏, 松本 哲, 他: 臨床分離 *Candida* 属および *Aspergillus* 属真菌の micafungin 感受性 (第2報)。日化療誌 2008; 56: 344-52
- 8) Espinel-Ingroff A: In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 121-36
- 9) Matsue K, Uryu H, Koseki M, Asada N, Takeuchi M: Breakthrough trichosporonosis in patients with hematologic malignancies receiving micafungin. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 753-7
- 10) Akagi T, Yamaguti K, Kawamura T, Nakamura T, Kubo K, Takemori H: Breakthrough trichosporonosis in patients with acute myeloid leukemia receiving micafungin. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 1182-3
- 11) Asada N, Uryu H, Koseki M, Takeuchi M, Komatsu M, Matsue K: Successful treatment of breakthrough *Trichosporon asahii* fungemia with voriconazole in a patient with acute myeloid leukemia. *Clin Infect Dis* 2006; 43: e39-41
- 12) Bayramoglu G, Sonmez M, Tosun I, Aydin K, Aydin F: Breakthrough *Trichosporon asahii* fungemia in neutropenic patient with acute leukemia while receiving caspofungin. *Infection* 2008; 36: 68-70
- 13) Rieger C, Geiger S, Herold T, Nickenig C, Ostermann H: Breakthrough infection of *Trichosporon asahii* during posaconazole treatment in a patient with acute myeloid leukaemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 843-5
- 14) Hosoki K, Iwamoto S, Kumamoto T, Azuma E, Komada Y: Early detection of breakthrough trichosporonosis by serum PCR in a cord blood transplant recipient being prophylactically treated with voriconazole. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008; 30: 917-9
- 15) Suzuki K, Nakase K, Kyo T, Kohara T, Sugawara Y, Shibazaki T, et al: Fatal *Trichosporon* fungemia in patients with hematologic malignancies. *Eur J Haematol* 2010; 84: 441-7
- 16) 田代隆良, 永井寛之, 山崎 透, 後藤陽一郎, 秋月真一郎, 那須 勝: 播種性トリコスポロン感染症の菌学的, 免疫組織学的研究。感染症誌 1993; 67: 704-11
- 17) Pini G, Faggi E, Donato R, Fanci R: Isolation of *Trichosporon* in a hematology ward. *Mycoses* 2005; 48: 45-9
- 18) Wolf D G, Falk R, Hacham M, Theelen B, Boekhout T, Scorzetti G, et al: Multidrug-resistant *trichosporon asahii* infection of nongranulocytopenic patients in three intensive care units. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4420-5
- 19) 中村智次, 酒井俊彦, 福沢正男, 羽山正義, 発地雅夫: まれな深在性真菌症の病理 トリコスポロン症を中心に。日本医真菌学会雑誌 1993; 34: 155-63
- 20) Krcmery V Jr, Mateicka F, Kunová A, Spánik S, Gyarfás J, Sycová Z, et al: Hematogenous trichosporonosis in cancer patients: report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazol. *Support Care Cancer* 1999; 7: 39-43
- 21) Girmenia C, Pagano L, Martino B, D'Antonio D, Fanci R, Specchia G, et al: Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1818-28
- 22) Haupt H M, Merz W G, Beschorner W E, Vaughan W P, Saral R: Colonization and infection with *Trichosporon* species in the immunosuppressed host. *J Infect Dis* 1983; 147: 199-203
- 23) 久米 光: 深在性真菌感染症の現況と対策。Jpn J Antibiot 2009; 62: 545-50

Investigation on isolation of *Trichosporon* species in clinical practice

Noriyo Kawasumi¹⁾, Yuka Yamagishi¹⁾, Mao Hagihara¹⁾,
Eriko Fujimaki¹⁾, Takashi Sugita²⁾ and Hiroshige Mikamo¹⁾

¹⁾ Department of Infection Control and Prevention, Aichi Medical University Hospital, 1-1 Yazakokarimata, Nagakute, Aichi, Japan

²⁾ Department of Microbiology, Meiji Pharmaceutical University

Trichosporon species are the environmental fungi found in soil and are important as the pathogens in opportunistic infections. They are also important as one of the causes for breakthrough infections due to inappropriate use of antifungal agents. We investigated the correlation between the consumption and the frequency of *Trichosporon* isolation. We retrospectively investigated the patients' background in 62 patients in whom *Trichosporon* was isolated during the period from 2003 through 2009 at Aichi Medical University Hospital. Statistic analysis was performed with Spearman's rank correlation coefficient test. We judged the difference to be significant when Spearman's rank correlation coefficients were >0.786 ($p < 0.05$). *Trichosporon* species were the most frequently isolated from urine, followed by sputum and stool samples. Random amplified polymorphic DNA analysis using 8 primers showed possible nosocomial infections. The isolation number of *Trichosporon* species was associated with the total amount of micafungin (MCFG) usage and the ratio of MCFG usage with 0.811 ($p = 0.03$) and 0.613 ($p = 0.14$) of the rank correlation coefficients, respectively. The isolation of *Trichosporon* species was significantly correlated with the absolute amount ($p < 0.05$) rather than the relative amount of MCFG. Since inappropriate use of antifungal agents could lead to the breakthrough of fungal infections, we should also consider the heterogenetic use of antifungal agents in each hospital.