

Strategimøte nr 27, 2013:

Soppinfeksjoner

Hovedredaktører:

Per Sandven

Martin Steinbakk

Programgruppe:

Cecilie Torp Andersen (leder)

Peter Gaustad

Kjersti Wik Larssen

**EKSTERNE KVALITETSVURDERINGER I BAKTERIOLOGI, MYKOLOGI OG
PARASITTOLOGI**

Hovedredaktører: Per Sandven og Martin Steinbakk

Strategimøte nr 27, 2013

Soppinfeksjoner

1. november 2013, kl. 09.30 – 16.00
Gjestehuset Lovisenberg

Programgruppe

*Cecilie Torp Andersen (leder),
Peter Gaustad og Kjersti Wik Larssen*

Forord

Det 27. strategimøtet i regi av Referansegruppen for eksterne kvalitetsvurderinger i bakteriologi, mykologi og parasittologi omhandlet ”Soppinfeksjoner” og ble avholdt 01.11.2013 i Oslo. På møtet deltok 46 representanter fra landets medisinsk-mikrobiologiske laboratorier.

Ansvarlig programkomité, som også har ferdigstilt denne avsluttende rapporten, var Cecilie Torp Andersen (leder), Peter Gaustad og Kjersti Wik Larssen. Det har tatt tid å ferdigstille rapporten siden det har vært mye stoff som skulle gjennomarbeides.

Rapporten inneholder en innledende og oppsummerende del som er ført i pennen av programkomiteen i forståelse med forfatterne av innleggene. I tillegg gjengis et gjennomarbeidet sammendrag av forelesernes innlegg med referanser som ble sendt ut til alle deltakere i forkant av møtet.

Vi håper rapporten vil vise seg å bli nyttig for de enkelte laboratoriene.

Oslo, 26.10.2015

For Referansegruppen

Per Sandven

Martin Steinbakk

INNHALDSFORTEGNELSE

PROGRAM	6
DELTAKERE	7
1 SAMMENDRAG OG KONKLUSJONER	9
1.1 BAKGRUNN	9
1.2 MEDISINSK MYKOLOGI- HVA FORVENTER KLINIKERNE AV LABORATORIENE I 2013.....	10
1.3 SOPP I BLODKULTUR:	10
1.4 PRØVETAKING OG FORSENDELSE TIL MYKOLOGISKE ANALYSER	11
1.5 DYRKNING	13
1.6 MIKROSKOPI I DIAGNOSTIKK AV SOPPINFESJONER	15
1.7 SEROLOGISKE TESTER OG ANTIGENPÅVISNING VED SOPPINFESJONER	16
1.8 MOLEKYLÆRBIOLOGISKE UNDERSØKELSER VED SOPPINFESJONER	18
1.9 IDENTIFISERING AV SOPPISOLAT VED HJELP AV MALDI TOF MASSESPEKTROGRAFI.....	19
1.10 RESISTENSBESTEMMELSE AV SOPP.....	19
1.11 SERUMKONSENTRASJONSMÅLINGER AV SOPPMIDLER	20
1.12 MIKROBIOLOGISK DIAGNOSTIKK VED GJÆRSOPPINFESJONER.....	22
1.13 MIKROBIOLOGISK DIAGNOSTIKK VED MUGGSOPPINFESJONER.....	23
1.14 DIAGNOSTIKK VED <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECHII</i> INFESJONER	25
1.15 MIKROBIOLOGISK DIAGNOSTIKK AV ENDEMISKE MYKOSER	27
1.16 LABORATORIESIKKERHET VED HÅNDTERING AV SMITTERISIKOGRUPPE 3 AGENS I MYKOLOGIEN	28
1.17 MIKROBIOLOGISK DIAGNOSTIKK VED DERMATOFYTTINFESJONER	30
1.18 NASJONALT REFERANSELABORATORIUM.....	31
2 INNLEGGENE PÅ MØTET	34
2.1 MEDISINSK MYKOLOGI- HVA FORVENTER KLINIKERNE AV LABORATORIENE I 2013.....	34
2.2 SOPP I BLODKULTUR	35
2.3 PRØVETAKING OG FORSENDELSE TIL MYKOLOGISKE ANALYSER	40
2.4 DYRKNING INKLUSIV TABELLARISK OVERSIKT OVER PRØVEMATERIALE OG DYRKNINGSBETINGELSER VED ULIKE KLINISKE PROBLEMSTILLINGER (UNNTATT DERMATOFYTTTER)	43
2.5 MIKROSKOPI I DIAGNOSTIKK AV SOPPINFESJONER	45
2.6 SEROLOGISKE TESTER OG ANTIGENPÅVISNING VED SOPPINFESJONER	49
2.7 MOLEKYLÆRBIOLOGISKE UNDERSØKELSER VED SOPPINFESJONER	56
2.8 IDENTIFISERING AV SOPP VED HJELP AV MALDI TOF MASSESPEKTROGRAFI.....	61
2.9 RESISTENSBESTEMMELSE AV SOPP	64
2.10 SERUMKONSENTRASJONSMÅLINGER AV ANTIMYKOTIKA	70
2.11 MIKROBIOLOGISK DIAGNOSTIKK VED GJÆRSOPPINFESJONER.....	73
2.12 MIKROBIOLOGISK DIAGNOSTIKK VED MUGGSOPPINFESJONER.....	87
2.13 DIAGNOSTIKK VED <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECHII</i> INFESJONER	90
2.14 MIKROBIOLOGISK DIAGNOSTIKK AV ENDEMISKE MYKOSER	96
2.15 LABORATORIESIKKERHET VED HÅNDTERING AV KLASSE 3 AGENS I MYKOLOGIEN	101
2.16 MIKROBIOLOGISK DIAGNOSTIKK VED DERMATOFYTTINFESJONER	103
2.17 NASJONALT REFERANSELABORATORIUM FOR MEDISINSK MYKOLOGI	110

Program

Tid	Tema	Innleder
09:30	Innledning og velkommen	
09:40	Medisinsk mykologi- hva forventer klinikerne av laboratoriene i 2013	Ingvild Nordøy
09:50	Sopp i blodkultur	Liv Hesstvedt
10:00	Prøvetaking og forsendelse ved mistanke om soppinfeksjon	Nicola Isabelle Kols
10:05	Utsæd og dyrkningsbetingelser ved ulike kliniske problemstillinger	Karianne Wiger Gammelsrud
10:10	Mikroskopi i diagnostikk av soppinfeksjoner	Kjersti Wik Larssen
10:15	Soppserologi og antigenester	Cecilie Torp Andersen
10:25	Diskusjon	
10:45 Kaffe		
11:05	Genteknologiske metoder i mykologien 10 min	Fredrik Muller
11:15	MALDI-TOF massespekterbasert teknologi i mykologien	Andre Ingebretsen
11:30	Resistensbestemmelse av sopp	Maiken Cavling Arendrup
12:10	Diskusjon	
12:30	Serumkonsentrasjonsmålinger av antimykotika	Stein Bergan
12:40 Lunsj		
13:25	Diagnostikk ved gjærsoppinfeksjoner	Cecilie Torp Andersen
13:40	Diagnostikk ved muggsoppinfeksjoner	Peter Gaustad
13:55	Diagnostikk ved <i>Pneumocystis jirovecii</i> infeksjoner	Fredrik Muller
14:10	Diagnostikk ved infeksjon med dimorf sopp	Kjersti Wik Larssen
14:20	Laboratoriesikkerhet ved håndtering av klasse 3 agens i mykologien	Egil Lingaas
14:30 Kaffe		
14:50	Diagnostikk ved dermatofyttinfeksjoner	Aasmund Fostervold
15:00	Nasjonalt referanselaboratorium for medisins mykologi	Cecilie Torp Andersen
15:10	Diskusjoner og anbefalinger	
16:00 Slutt		

Deltakere

Jan Egil Afset
Avdeling for medisinsk mikrobiologi,
St Olavs Hospital HF, 7006 Trondheim

Cecilie Torp Andersen
Mikrobiologisk avdeling,
Postboks 4950 Nydalen
OUS Rikshospitalet,
0027 Oslo

Anita B. Andreassen
Mikrobiologisk avdeling.
Sykehuset i Vestfold HF,
Postboks 2168,
3103 Tønsberg

Maiken Cavling Arendrup,
Statens Serum Institut
Artillerivej 5
2300 København S

Stein Bergan
Medisinsk biokjemi
seksjon for farmakoterapi
OUS Rikshospitalet
Postboks 4950 Nydalen
0027 Oslo

Trond Berntsen
Avdeling for medisinsk mikrobiologi,
Sykehuset Innlandet HF,
2629 Lillehammer

Synne H Bjørdal
Mikrobiologisk avdeling
OUS Rikshospitalet
Postboks 4950 Nydalen
0027 Oslo

Lumnije Dedi
Mikrobiologisk avdeling,
OUS, Ullevål
Postboks 4956 Nydalen
0424 Oslo

Birgit Margrethe Falch
Mikrobiologisk avd.
Sykehuset i Vestfold
Postboks 2168 Postterminalen,
3103 Tønsberg

Siri Feruglio
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 Oslo

Aasmund Fostervold
Mikrobiologisk avdeling
Pb 8100,
4068 Stavanger

Karianne Wiger Gammelsrud
Mikrobiologisk avdeling,
Postboks 4950 Nydalen
OUS Rikshospitalet
0027 Oslo

Peter Gaustad
Mikrobiologisk avdeling,
Postboks 4950 Nydalen
OUS Rikshospitalet
0027 Oslo

Lene Haakensen
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt
Postboks 4404 Nydalen,
0403 Oslo

Reidar Hjetland
Mikrobiologisk avdeling,
Helse Førde HF,
Sentralsjukehuset,
6800 FØRDE

Unn Houge
Sørlandet sykehus SSK
Postboks 416,
4604 Kristiansand

Mina Øydis Høie
Vestre Viken HF, Seksjon Bærum
3004 Drammen

Andre Ingebretsen
Avd. for mikrobiologi og Avd. for
smittevern
OUS Rikshospitalet
Postboks 4950 Nydalen

Synne H. Jenum
Vestre Viken HF, Seksjon Bærum
3004 Drammen

Bjørn Odd Johnsen
Mikrobiologisk avdeling,
Akershus Universitetssykehus HF,
1474 Lørenskog

Nicola Kols
Avdeling for medisinsk mikrobiologi,
St Olavs Hospital HF,
7030 Trondheim

Angela Kümmel
Avd. for Laboratoriemedisin
Sykehuset Levanger
Postboks 333
7601 LEVANGER

Astri Lervik Larsen
Sykehuset Østfold,
1603 Fredrikstad

Kjersti Wik Larssen
Avd for medisinsk mikrobiologi,
St Olavs Hospital
7006 Trondheim

Egil Lingaas
Avdeling for smittevern,
Oslo universitetssykehus
Postboks 4950 Nydalen,
0424 Oslo

Turid Mannsåker
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 Oslo

Unni Molnes
Mikrobiologisk avdeling,
OUS Rikshospitalet
Postboks 4950 Nydalen

Fredrik Muller
Mikrobiologisk avdeling,
OUS Rikshospitalet,
0027 Oslo

Aina Myhre
Mikrobiologisk avdeling,
OUS Rikshospitalet
Postboks 4950 Nydalen

Haima Mylvaganam
Haukeland Universitetssykehus,
Postboks 1, N-5021 Bergen

Ingvild Nordøy
Seksjon for klinisk immunologi og
infeksjonssykdommer,
OUS Rikshospitalet
Postboks 4950 Nydalen

Krisztina Papp
Vestre Viken HF, Seksjon Drammen
3004 Drammen

Trond E. Ranheim
Mikrobiologisk avdeling,
Akershus Universitetssykehus HF,
1474 Lørenskog

Malgorzata Richter
Lab for Med Mikrobiologi,
Haugesund sykehus
Helse Fonna, Postboks 2170,
5504 Haugesund

Monica Romstad
Avd. for medisinsk mikrobiologi,
Stavanger Univ.sjukehus
Helse Stavanger HF,
Postboks 8100,
4068 Stavanger

Sunniva Fagerås Røst
Mikrobiologisk enhet
OUS - Radiumhospitalet
Montebello
0310 Oslo

Per Sandven
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 Oslo

Martin Steinbakk
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 Oslo

Tore Taksdal Stubhaug
OUS, Ullevål
Pb. 4956 Nydalen,
0424 Oslo

Liv Jorunn Sønsteby
Mikrobiologisk laboratorium,
Haugesund sykehus,
Postboks 2170,
5504 Haugesund

Trygve Tjade
Først Medisinsk Laboratorium
Søren Bullsvei 25,
1051 Oslo

Sissel Veøy
Først Medisinsk Laboratorium
Søren Bullsvei 25,
1051 Oslo

Einar Vik
Mikrobiologisk laboratorium
Helse Nordmøre og Romsdal HF
6407 Molde

Heidi Cecilie Villmones
Sykehuset i Vestfold, Tønsberg
Postboks 2168, 3103 Tønsberg

Kari Ødegaard
Avdeling for medisinsk mikrobiologi,
Sykehuset Innlandet HF,
2629 Lillehammer

Sandra Åsheim
Bakteriologisk enhet,
Avd. for laboratoriemedisin,
Nordlandssykehuset HF,
8092 Bodø

1 Sammendrag og konklusjoner

1.1 Bakgrunn

Møtets hovedfokus var diagnostikk ved invasive mykoser. Dermatofytt-diagnostikken ble likevel viet plass i et eget kapittel siden dette fortsatt er en viktig del av soppdiagnostikken ved de enkelte laboratoriene. Problemstillingene med sopp som årsak til allergiske lidelser og «syke hus» samt temaet mykotoksiner er utelatt. I Norge ivaretas dette i stor grad utenfor våre mikrobiologiske avdelinger.

Kjente risikogrupper for invasiv sopp sykdom er immunkompromiterte og kritisk syke pasienter, se tabellen under. Det er viktig at både klinikere og mikrobiologer tenker på muligheten for soppinfeksjon slik at diagnostikk og behandling ikke blir forsinket. Internasjonalt rapporteres en trend med økning av invasiv sopp sykdom, økende andel non-albicans gjærsoppisolater og om en økende forekomst av resistente stammer. Dette har vi så langt sett lite til i Norge. I Norge utgjør *C. albicans* fortsatt nærmere 70% av candidemisolatene og *A. fumigatus* er den hyppigst forekommende invasive muggsopparten. Økt bruk av soppmidler, økende bruk av profylakse og økende bruk av bredspektret soppbehandling kan endre både speciesdistribusjonen og forekomsten av resistens også hos oss. I andre europeiske land observeres også en økt forekomst av azolresistente *A. fumigatus* med opphav fra miljø og landbruk. Rask identifisering og korrekt resistensbestemmelse av soppisolat må antas å få økende betydning for optimal pasientbehandling i fremtiden.

Viktige risikofaktorer for invasive soppinfeksjoner¹

Risikofaktorer	Sopp	Viktige pasientgrupper
Nøytropeni	Cand, Asp, Crypt, Zyg	Hematologisk cancer, benmarg/ stamcelletransplantasjon, aplastisk anemi
Corticosteroider, Cytostatika Immunosuppressiva	Cand, Asp, Crypt, Zyg, PJ	Hematologisk cancer, autoimmune sykdommer, transplantasjon (organ-, stamcelle-), GVHD
Bredspektret antibiotikaterapi	Cand, Asp	Mange pasientgrupper, bl.a. intensivpasienter
Omfattende kirurgi (abdominal, thorax)	Cand	Postoperative pasienter
Sentrale venekatetre	Cand	Mange pasientgrupper, bl.a. intensivpasienter
Kolonisering med sopp	Cand, Asp	Mange pasientgrupper
HIV-relatert immunsvikt	PJ, Crypt, Asp	HIV-pasienter
Akutt nyresvikt	Cand	Intensivpasienter
Ketoacidose	Zyg	Diabetes
Omfattende byggearbeid i sykehus	Asp	Benmarg-/stamcelle-transplantasjon

Cand= Candida, Asp= Aspergillus, Crypt = Cryptococcus, Zyg= Zygomycetes,
PJ= Pneumocystis jirovecii

¹ Fra Nasjonal faglig retningslinje for antibiotikabruk i sykehus: Invasive soppinfeksjoner
<http://sites.helsedirektoratet.no/sites/antibiotikabruk-i-sykehus/terapikapitler/invasive-soppinfeksjoner/Sider/default.aspx>

1.2 Medisinsk mykologi- hva forventer klinikerne av laboratoriene i 2013

Invasive soppinfeksjoner er av de infeksjonene vi frykter mest pga. høy dødelighet. For en kliniker er det et hovedproblem at invasiv soppinfeksjon gir uspesifikke symptomer. Diagnostiske verktøy for rask og spesifikk diagnose mangler. Selv om vi de siste 20 årene har fått flere behandlingsalternativer, vet vi enda ikke om dette faktisk har redusert dødeligheten ved disse infeksjonene. Studier viser at det er av betydning å starte riktig behandling tidlig. Vi ender derfor ofte opp med empirisk behandling som kan medføre bivirkninger og vanskeliggjøre annen behandling siden flere soppmidler interagerer til dels betydelige med andre medikamenter. Slik soppbehandling er også svært kostbar.

Fra en klinikers ståsted er det ønskelig raskt å få avklart om det dreier seg om en soppinfeksjon. Tester som har høy negativ prediktiv verdi vil også være til hjelp for å unngå overbehandling. Diagnostikk som raskt påviser soppinfeksjonen vil kunne hjelpe oss å starte målrettet behandling tidlig.

1.3 Sopp i blodkultur:

Anbefalingene om gjærsopp i blodkultur fra strategimøtet i 2002 med oppdateringer fra 2004 gjelder fortsatt.

Soppdyrkning i blod bør foretas både ved klinisk mistanke om soppsepsis og som rutine ved mistanke om alvorlig infeksjon hos pasienter i risikogrupperne.

Ett blodkultursett defineres som blodkultur (en eller flere flasker) tatt ved ett innstikk.

Blodvolum:

Antall gjærceller i blodet under en candidemi er ofte lavt (<1 cfu/ml). European Society for Clinical Microbiology and Infectious Disease (ESCMID) anbefaler derfor at det tappes 40-60 ml blod pr. episode hos voksne. Anbefalt blodvolum hos barn er avhengig av vekt, se tabell. Fra større barn (> 36-40 kg) tappes samme blodvolum som fra voksne. (1)Anbefalingene sammenfaller med amerikanske retningslinjer (IDSA)(2).

	<u>Mengde pr flaske</u>	<u>Total volum</u> ¹	<u>Antall sett</u>	<u>Medium</u>
<u>Voksne</u>	<u>10 ml</u>	<u>40-60 ml</u>	<u>2</u>	<u>Bactec: Aerob + anaerob+ sopp flaske</u> <u>Bactec: 2 aerobe + 1 anaerob flaske</u> <u>BactAlert: 2 aerobe + 1 anaerob flaske</u>
<u>Nyfødt (< 2 kg)</u>	<u>(0,5)1-2 ml</u>	<u>2-4 ml</u>	<u>2</u>	<u>2 Ped flasker a 1-2 ml</u>
<u>Barn 2-12 kg</u>	<u>1-3 ml</u>	<u>6 ml</u>	<u>2</u>	<u>2 Ped flasker a 3 ml</u>
<u>Barn 12-36 kg</u>	<u>10 ml</u>	<u>20 ml</u>	<u>2</u>	<u>2 aerobe flasker a 10 ml</u> ² <u>Alternativt Ped flaske + soppflaske x 2</u> ³

¹ESCMID Guideline 2012

²IDSA 2013 anbefaler kun aerobe flasker til barn < 36 kg

³Avhengig av problemstilling: Anaerob flaske på indikasjon mukositt, GI symptomer, enterocolitt. Soppflaske mindre påkrevet hvis det ikke er mistanke om blandingsinfeksjon da *C. glabrata* fortsatt er sjelden hos små barn.

Blodkultursystemer:

Det er pt. to blodkulturleverandørene på det norske markedet:

- BactAlert: Aerobe flasker er gode til å detektere gjærsopp, inklusiv *C. glabrata*.

- Bactec: Aerobe flasker er gode for påvisning av de fleste gjærsopparter med unntak av *C. glabrata*. En selektiv soppflaske oppveier denne ulempen og den selektive flasken er overlegen for deteksjon av sopp ved blandingsinfeksjoner med bakterier.

Ved mistanke om eller risiko for fungemi :

På sykehus som benytter Bactec anbefales:

- Mycosisflasken som supplement til aerob og anaerob flaske.
- 2 sett pr episode

På sykehus hvor selektiv soppflaske *ikke* benyttes anbefales:

- en ekstra aerob blodkulturflaske pr sett alternativt :
- 3 sett for å oppnå optimalt blodvolum pr episode

Inkubasjonstid: Blodkulturene inkuberes i 5-7 dager. Hvis man har kapasitet anbefales 7 døgn ved mistanke om sopp, lenger ved mistanke om dimorf sopp.

Utsæd: Kromagar som anbefales til foreløpig identifisering og for å avdekke eventuell blandingskultur med ulike sopparter. Skålene inkuberes i 3 døgn. Spesielle pasientgrupper kan kreve spesiell håndtering, for eksempel ved infeksjon med *Malazzesia* spp. hos premature og nyfødte eller ved mistanke om dimorf sopp.

Identifikasjon og resistensbestemmelse: Rask identifikasjon til artsnivå bør utføres ved alle laboratorier. Større laboratorier bør også kunne utføre resistensbestemmelse. Alle candidemiisolat innsendes til referanselaboratoriet for verifisering, resistensbestemmelse og epidemiologisk overvåkning.

Råd om behandling: *Candida* spp. isolert fra blodkultur tatt perifert *eller* fra CVK definerer candidemi og skal *alltid* behandles. Ved livstruende sykdom, spesielt hos immunosupprimerte pasienter, anses nå echinocandiner som førstevalg. Ved andre problemstillinger og pasienter < 65 år, er fortsatt flukonazol et godt alternativ i Norge. Anbefalt behandlingstid ved candidemi er 14 dager etter at blodbanen er sterilisert. ESCMID anbefaler daglig blodkultur inntil dette oppnås. (1) Gjentatte blodkulturer anbefales også for å følge behandlingsrespons. Kliniker bør vurdere å fjerne CVK ved påvist candidemi.

1) Clin Microbiol Infect 2012;18(Suppl. 7): 9-18 og 19-37

2) Clin Infect Dis. (2013) 57 (4): e22-e121 doi:10.1093/cid/cit278

http://www.idsociety.org/Other_Guidelines/#Other

1.4 Prøvetaking og forsendelse til mykologiske analyser

Prøvetaking av materiale til mykologiske analyser bør tas på en adekvat måte, etterfulgt av rask forsendelse til laboratoriet for å ha mest optimal soppdiagnostikk.

Samarbeid med og informasjon til aktuelle kliniske avdelinger er viktig for å sikre at biopsier og vevsprøver undersøkes *både* av patolog og mikrobiolog ved mistanke om soppinfeksjon.

Ved kliniske problemstillinger hvor direkte inokulasjon av prøvemateriale (ikke blod) på soppmedium kan være indisert, er det anbefalt å avtale dette med laboratoriet.

Under strategimøtet ble det tatt opp svært få diskusjonspunkter, noe som gjenspeiler at det er stor grad av konsensus i litteraturen.

Sterile prøvematerialer	Prøvetaking	Forsendelse	Kommentar
Benmarg	Optimalt prøvevolum: <ul style="list-style-type: none"> - barn 0.5 ml - voksne 3.0 ml • aseptisk prøvetaking i heparinrør (ev. pediatrik isolatorrør) • Levret benmarg er ikke akseptabelt. 	Benmarg bør helst ankomme laboratoriet innen 15 minutter i romtemperatur og aldri nedkjølt.	Anbefalt prøvemateriale ved mistanke på disseminert candidiasis, kryptokokkose, <i>Penicillium marneffeii</i> eller histoplasmose. Benmarg inokulert på blodkulturflasker kan gi falsk positivt signal grunnet CO ₂ -dannelse fra leukocytene.
Blod	<ul style="list-style-type: none"> • 40-60 ml blod pr. episode hos voksne • Soppflaske der dette er tilgjengelig • Barn avhengig av vekt 	Rask forsendelse til laboratoriet. 2-4 timer	Se også avsnitt 1.3
Spinalvæske	<ul style="list-style-type: none"> • 3-5 ml 	Steril beholder Rask forsendelse til laboratoriet < 2 timer. Evt. inokulasjon i blodkulturmedium	
Sterile kroppsvæsker ascites pleuravæske thoracocentesevæske synovialvæske leddvæske	Prøvevolum <ul style="list-style-type: none"> • Helst > 2 ml • Ascites 5-10 ml Inokulasjon i blodkulturmedium evt i heparinrør el isolatorrør	Unngå koagulasjon Rask forsendelse til laboratoriet < 2 timer	
Vevsprøver og aspirat	steril beholder med litt sterilt saltvann uten tilsetning for å unngå uttørring	Rask forsendelse < 2 timer	

Ikke-sterile prøvematerialer	Prøvetaking	Forsendelse	Kommentar
Dermatofytpåvisning eller dyrkning av hudavskrap, hår eller negl	For soppdyrkning av hudavskrap er det anbefalt å desinfisere hud med 70 % alkohol før prøvetaking. Hudavskrap skal tas fra kanten av lesjonen. Minst 10 hår med røtter. Steril (tann)børste kan i tillegg benyttes på infisert hodebunn. Infiserte negler skal skrapes eller klippes av.	Steril beholder Mange laboratorier ønsker <i>ikke</i> å motta materiale mellom 2 objektglass. Innen 72 timer. Romtemperatur.	Se eget avsnitt
Kornea-avskrap	Kornea-avskrap bør taes av øyelege og sås ut umiddelbart på ikke-inhibitorisk soppmedium Preparat til mikroskopi	Sendes umiddelbart til laboratoriet i romtemperatur.	Lokale avtaler bør inngås for optimal håndtering
Nasopharynx-sekret	Prøvetakingspinne Steril beholder	Kan oppbevares i romtemperatur i opptil 2 timer etter prøvetaking. Utover dette ved 4°C	Virustransportmedium er ikke egnet til soppanalyser

Ikke-sterile prøvematerialer	Prøvetaking	Forsendelse	Kommentar
Indusert sputum /ekspektorat /bronkialskyllvæske	Steril beholder	Kan oppbevares i romtemperatur i opptil 2 timer etter prøvetaking. Utover dette ved 4°C	Prøver fra nedre luftveier, spesielt sputum /ekspektorat eldre enn 24-timer, er uegnet til soppdyrking pga. risiko for overvekst av normalflora fra øvre luftveier.
Prostatasekret	Prøvetaking etter prostatomassasje evt. urinprøve etter prostatomassasje. I steril beholder.	Inokuleres direkte på soppmedium eller rask transport til laboratoriet Bør oppbevares i romtemperatur.	Pasienter med blastomykose eller kryptokokkose kan ha infeksjon i prostata.
Sekret fra bihuler/sår i nese ved mistanke om soppinfeksjon	Penselprøve er ikke anbefalt prøvemateriale. Se vevsprøver		Dyrkning av neseprøver kan ikke benyttes til diagnostikk av sinusinfeksjon. Ved bihuleinfeksjon anbefales aspirat eller vev fra kirurgisk inngrep Lesjoner/sår i nese krever biopsitaking eller avskrap fra sårkanten.
Sekret fra slimhinner	Penselprøve. Forsøk å unngå tungen.	Forsendelse ved romtemperatur helst innen 2 timer	Lesjoner/sår i munnhule krever biopsitaking eller avskrap fra sårkanten.
Urin	Midtstrømsprøve, suprapubisk eller kateterisert morgenurin i steril beholder eller prøveglass med borsyre.	Sendes i innen 1-2 timer i romtemperatur Hvis dette ikke er mulig, bør urinprøven sendes nedkjølt i temperatur ved 4 °C.	
Vaginalsekret	Prøvepinne eller avskrap ved mistanke på residiverende soppinfeksjon	Prøven oppbevares i romtemperatur sendes til laboratoriet innen 2 -12 timer (prøvepinner i adekvat transport-medium)	
Øyesekret	Pensel		Væske fra Corpus vitreum, se sterile væsker

1.5 Dyrkning

- inklusiv tabellarisk oversikt over prøvemateriale og dyrkningsbetingelser ved ulike kliniske problemstillinger (unntatt mistanke om dimorf sopp og dermatofytter)

Det var ingen kontroverser om temaet under møtet, men internasjonalt er det sprikende anbefalinger for bruk av ulike medier, inkubasjonslengde og temperatur. Dette er til dels begrunnet i ulik forekomst av endemiske mykoser og ulikt fokus på vekst av muggsopp i ulike pasientpopulasjoner. For norske forhold er det viktig å finne en generell anbefaling til bruk ved ulike problemstillinger, med anbefaling om en ekstra innsats for eksempel der en

finner sopphyfer i vev. For håndtering av prøver og dyrkingsbetingelser ved mistanke om dimorf sopp og dyrkning av dermatofytter, se 1.15, 1.16 og 1.17).

Forbehandling: Før utsæd på skåler er forbehandling av prøven et kritisk punkt for et vellykket resultat.

Sentrifugering, 1500 g i 5-10 min, eventuelt med resuspensjon av et gitt volum før utsæd.

- Flytende materialer som spinalvæske, BAL, peritoneal dialysevæske og aspirat

Forbehandling med mukolytisk middel (0,5 % pancreatin, 0,5% N-acetyl-L-cysteine eller Sputolysin)

- mukoide prøver som ekspektorat og andre slimete prøver fra luftveier.

Biopsier skal skjæres eller klippes, ikke mortres eller homogeniseres; især Mucoralishyfer er svært ømfintlige.

Medier: Sopp vokser godt på mange rutinemedier, men kan hemmes av normalflora.

Påvisning av langsomtvoksende arter kan vanskeligjøres av samtidig forekommende hurtigvoksende sopp. Sabouraud agar (SAB) er velegnet for de fleste sopparter, og kromskål er nyttig om og når det er viktig å påvise blandingskultur av ulike candidaarter. Maltagar er overlegen for påvisning av muggsopp.

I prøver hvor gjærsopp er mest aktuelt anbefales utsæd på SAB. Kromskål bør legges til der soppen er en del av normalflora eller hvor rask identifikasjon av blandingsflora er essensielt (f. eks. positiv blodkultur, abscesser). Dyrkning mtp muggsopp er indisert i ulike risikogrupper og prøvematerialer og man bør vurdere å supplere SAB-skålen med maltagar hos slike pasienter. Unntaksvis anbefales et rikere medium som brain heart infusjon (BHI) agar, især ved mistanke om dimorf sopp. Viktig materiale fra presumptivt sterile områder kan også dyrkes i aerob blodkulturflaske eller Myco/F Lytic mediet med forlenget inkubering. Disse flaskene må inspiseres mtp soppballer, og det anbefales blindutsæd før de svares ut som negative.

Stort utsædsvolum er essensielt for oppvekst av muggsopp i luftveisprøver (100µL).

Inkubasjonstid og temperatur: Mest hensiktsmessig er en tilnærming med utsæd på SAB i 37 grader med 2-3 dagers inkubering av prøver hvor gjærsopp er mest aktuelt.

Inkubasjonstiden bør forlenges til 7 døgn ved prøver fra normalt sterile områder. Ved mistanke om muggsopp bør skåler også inkuberes ved 28-30 grader i minst 1 uke, helst i 14 dager. Laboratoriets kapasitet og pasientenes risikoprofil må avgjøre inkubasjonslengden. Ved klinisk mistanke om kryptokokker og/eller dimorf sopp, eller ved positiv mikroskopi uten oppvekst bør inkubering forlenges til 4 uker.

Utsædstabell*:

Prøvemateriale	Medie(r)**	Temperatur	Tid	Kommentar
Abscess	SAB + krom	37°C	3 d.	Vurdere blodkulturflaske
Abscess (immunsupprimerte)	SAB + krom	37°C + 28°C	7 d.	Vurdere blodkulturflaske
Aspirat/væske (sterile områder)	SAB	37°C	7 d.	Vurdere blodkulturflaske
Benmarg	SAB	37°C + 28°C	7 d.	Vurdere blodkulturflaske
Biopsi/vev	SAB	37°C + 28°C	7 d.	Vevet må ikke mortres Vurder langtidsdyrkning
Blodkultur, utsæd av positiv	SAB + krom	37°C	3 d.	Evt egen Malassezia dyrkning***
Hud	SAB***	37°C	2-3 d.	Evt egen Malassezia dyrkning*** For dermatofytter: se eget innlegg

Prøvemateriale	Medie(r)**	Temperatur	Tid	Kommentar
Kateterspiss	SAB	37°C	2-3 d.	SVK: semikvantitativ utsæd
Luftveier (immunfriske)	SAB + krom	37°C	2-3 d.	Gjæringsopp=normalflora
Luftveier (immunsupprimerte CF, KOLS mm)	SAB + krom	37°C + 28°C	7 d.	Utsædsvolum 100µl
Spinalvæske	SAB	37°C	3 d.	4 uker ved kryptokokk- mistanke Vurdere blodkulturflaske
Sår	SAB	37°C	2-3 d.	
Sår (Brannskade/Diabetes/penetrende traume)	SAB + krom	37°C + 28°C	7 d.	
Urin	SAB	37°C	2-3 d.	
Vaginalpensel	SAB + krom	37°C	2-3 d.	

Forkortelser: SAB (Sabouraud agar); SVK (sentralvenøst kateter); d (dager)

*Ved mistanke om kryptokokker og/eller dimorf sopp, eller ved positiv mikroskopi uten oppvekst, bør inkubering forlenges til 4 uker.

**Vurder maltagar

*** Malassezia-skål/SAB m olivenolje

1.6 Mikroskopi i diagnostikk av soppinfeksjoner

Mikroskopi er en helt essensiell del i diagnostikk av soppinfeksjoner og brukes til:

- Direkte påvisning av sopp i klinisk materiale
 - Gir grunnlag for tidlig behandling (antimykotika, eventuelt kirurgi)
 - Ved typisk morfologi gi grunnlag for videre håndtering i klinikk og på laboratoriet (antimykotika, selektive medier, temperaturer, inneslutningsnivå)
- Konfirmere at vekst av sopp i kultur representerer infeksjon versus kontaminasjon
- Morfologisk identifikasjon av soppkulturer

Det var få kontroverser rundt metoder på møtet, og generell enighet om at direkte mikroskopi med tanke på å påvise soppelerner i større grad bør prioriteres.

Direkte mikroskopi av ulike typer prøvematerialer bør tilbys som hasteundersøkelse ved mistanke om invasiv mykose hos alvorlig syk og/eller immunsupprimert pasient.

Påvisning av sopp i normalt sterile materialer er alltid av betydning og ringes til kliniker straks. Betydningen av funn i andre materialer må vurderes i relasjon til problemstilling.

Fargemetoder ved direkte påvisning:

10% KOH + optical brightener (Calcofluor White, Blankophor)

- førstevalg i de fleste situasjoner.

Andre fargemetoder som Giemsa, India Ink eller fluorescerende antistoffer

- brukes som førstevalg eller supplement ved spesielle materialer og/ eller diagnoser.

For alle fargemetoder gjelder at soppelerner kan være ujevnt fordelt i materialet. Flere undersøkelser/ repeterte prøver kan være nødvendig, også dersom tvil om mikroskopifunnet er reelt eller et artefakt.

Mikroskopi for morfologisk identifikasjon:

Lactophenol cotton blue kan benyttes til artsidentifikasjon.

1.7 Serologiske tester og antigenpåvisning ved soppinfeksjoner

Gullstandardtester (f.eks. blodkultur) for påvisning av invasive soppinfeksjoner er lite sensitive og tar ofte lang tid. Pasientpopulasjonen ”at risk” øker og dødeligheten av disse infeksjonene er høy på tross av nye soppmidler og økende forbruk. Gjennom år er det derfor arbeidet for å utvikle tester som raskere og bedre kan identifisere pasienter med aktuell soppinfeksjon, både ved hjelp av surrogatmarkører for aktuelle agens og mer tradisjonelle serologiske tester. Bruken av surrogatmarkører for invasiv soppinfeksjon er lite utbredt i Norge, men er på vei inn i håndtering av ulike risikogrupper.

Aktuelle ”hurtigtester”

- lateral flow tester
 - kryptokokkantigen
 - aspergillusantigen
- agglutinasjonstester for påvisning av
 - kryptokokkantigen
 - candidaantigen

Serologisk påvisning av ulike soppantigener:

- galaktomannan- (aspergillus) antigen
- mannan (candida) antigen
- β -1,3-D-glukan en celleveggskomponent i de fleste sopparter,
 - ”Limulus ameocyte lysat” benyttes til serologisk påvisning
- I høyendemiske land tilbys antigenesting mot dimorfe sopparter.

Serologisk påvisning av ulike soppantistoff:

- antistoff mot aspergillus
- andre muggsopp
- candida (mannan)
- antistoff mot dimorfe sopparter

Immundiffusjon eller dobbeldiffusjon kan benyttes for påvisning av presipiterende antistoff mot *Aspergillus*, men metoden er mange steder erstattet med påvisning av IgG.

Immundiffusjon benyttes også for påvisning av antistoff mot dimorfe sopparter.

Total IgE og IgE antistoff mot ulike sopparter benyttes i utredning av allergisk sykdom og allergisk bronkopulmonal aspergillose (ABPA).

Valg av analytt og anbefalt metode for påvisning av de aktuelle agens avhenger av klinisk problemstilling og i stor grad insidensen til sykdommen som skal påvises.

Mange av testene som omhandles i rapporten er ikke optimale, men brukt fornuftig kan de bidra til tidligere diagnose, sikrere diagnostikk og forhåpentlig også være en indikasjon på *fravær* av aktuell sykdom.

Internasjonalt er det utarbeidet anbefalinger for nytten av flere av disse testene, mens det for nyere tester ikke er nok studier til å konkludere og disse utelates i oversikten, for mer utfyllende lesning vises til innleggene fra møtet.

Galaktomannan:

Utredning av aktuell aspergillusinfeksjon:

Galaktomannan kan påvises i serum, BAL, spinalvæske eller andre sterile væsker. Testen kan være indikasjon på aktuell aspergillusinfeksjon ved klinisk mistanke om slik infeksjon, men må vurderes i relasjon til risikogruppe, eventuell behandling og annen utredning, for eksempel radiologiske funn. Positiv test inngår i EORTC/MSG* kriterier for definisjon av invasiv aspergillusinfeksjon og anbefales av ESCMID**/ECIL 4*** som surrogatmarkør ved ulike kliniske problemstillinger.

- Påvisning i serum ved utredning av aktuell infeksjon hos risikopasienter.
- Hos ikke-nøytropene pasienter anses undersøkelse i BAL som en bedre markør på lungeinfeksjon da undersøkelse i serum hos denne pasientgruppen ofte er negativ.

Screening av utvalgte hematologiske pasienter i høyrisikogruppen mtp aspergillusinfeksjon.

Oftest som ledd i aktuell behandlingsprotokoll.

Fortrinnsvis ved

- langvarig nøytropeni
- ved GVHD etter benmargstransplantasjon

Testen bør utføres i serum 2 (-3 dager) pr uke i henhold til europeiske anbefalinger.

Ved stigende indeks som lar seg reproducere i ny prøve anbefales utredning (eks. CT/MR/BAL/biopsi) og oppstart av soppbehandling selv hos asymptomatiske pasienter siden testen ofte blir positiv før kliniske tegn på sykdom.

Utføres på OUS Rikshospitalet 3 ganger/uke.

β-1,3- D-glukan:

β-1,3- D-glukan er bestanddel i celleveggen til viktige humanpatogene sopparter med unntak av ulike Mucoralisarter og kryptokokker. Testen er derfor mer ”panfungalt” enn påvisning av galaktomannan. Den inngår i EORTC/MSG* definisjon av invasiv sopp sykdom på linje med galaktomannan og anbefales av ESCMID**/ECIL 4*** som surrogatmarkør ved ulike kliniske problemstillinger.

Screening anbefales minst 2 ganger ukentlig på linje med galaktomannan, men også denne testen er dårlig ved lav insidens av invasiv infeksjon og bør forbeholdes høyrisikogruppene. Påvisning av β-1,3- D-glukan som ledd i utredningen av akutt invasiv mykose hos immunosupprimerte og risikopasienter på indikasjon er også aktuelt, og testen synes å kunne ha potensiale til å skille mellom infeksjon og kolonisering med *Pneumocystis jirovecii* ved negativ mikroskopi. Det er et ønske å etablere et tilbud om β-1,3- D-glukan i Norge.

* European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Disease Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group.

** European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

*** European Conference on Infections in Leucaemia

Systematisk bruk av **Galaktomannan** og eventuelt **β -1,3- D-glukan** sammen med CT evt annen radiologisk diagnostikk er vist å kunne erstatte en feberbasert empirisk soppbehandling med en mer preemptiv eller diagnosebasert tilnærming. Målet er å kunne behandle færre pasienter, men mer målrettet, tidligere og forhåpentligvis med bedret prognose.

- Galaktomannan utføres på OUS Rikshospitalet 3 ganger/uke.
- β -1,3- D-glukan planlegges innført

Kryptokokkantigen bør tilbys som en pasientnær test på alle større sykehus og bør supplere eventuelt erstatte mikroskopi med tusj eller calcofluor white ved mistanke om kryptokokkmeningitt.

- Referanseundersøkelse med titerbestemmelse og kontroll av pågående behandling tilbys på OUS-Rikshospitalet.

1.8 Molekylærbiologiske undersøkelser ved sopp- infeksjoner

Molekylærdiagnostikk er et nyttig tillegg til annen diagnostikk for påvisning av sopp direkte i prøvematerialet, særlig ved invasive mykoser. Metodene vil sannsynligvis få økende betydning de kommende år. Et tilstrekkelig prøvevolum, samt korrekt forbehandling og nukleinsyre-ekstraksjon er helt nødvendige forutsetninger for et godt resultat. Det forventes bedre retningslinjer og standardisering på dette området. Også valg av målgen(er) og retningslinjer for utførelse av amplifiseringsreaksjonen (PCR eller tilsvarende) forventes bedre standardisert fremover.

Ved invasive mykoser har påvisning av bl a *Candida* DNA og *Aspergillus* DNA bedre sensitivitet enn andre metoder. Påvisning av *Pneumocystis jirovecii* DNA er en viktig del av pneumocystis-diagnostikken (sammen med immunmorfologisk metodikk). PCR og sekvensering av ITS1/2 kan benyttes til direkte påvisning i vev, men er også velegnet for identifikasjon av sopparter der en ikke kommer til målet med fenotypiske metoder, eventuelt med tillegg av andre målgener som β -tubulin og D1D2.

Lokalt pasientgrunnlag og etterspørsel etter molekylærdiagnostikk innen mykologi må være avgjørende for hvilke laboratorier som tar opp metodene, eller velger å sende prøver til annet laboratorium der disse metodene er i bruk.

På referanselaboratoriet finnes i dag et tilbud om direkte PCR for påvisning av

- *Pneumocystis jirovecii*
- *Aspergillus spp* og *Aspergillus fumigatus*
- Direkte”panfungale” PCR og sekvensering (ITS2 og D1D2)
- Dermatofytt PCR.
- Mucoralis(Zygomycetes) PCR (innført høsten 2015)

Det er utarbeidet protokoll for påvisning av soppgener i formalinfiksert vev og molekylærdiagnostikk kan bidra til artsidentifikasjon der patologene finner hyfer i vev, men sensitiviteten er dessverre dårligere enn i ferskt vev.

Det jobbes for å kunne tilby en PCR for påvisning av ulike Candidaarter i vev samt påvisning av resistensgener hos Candida. Sekvensering av ulike målgener benyttes dessuten til identifikasjon av ulike sopparter.

1.9 Identifisering av soppisolat ved hjelp av MALDI TOF massespektrografi

MALDI TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) massespektrometri erstatter i økende grad tradisjonell identifikasjon av ulike soppisolat. Metoden kan generelt sammenlignes med DNA-sekvensering når det gjelder identifisering.

Kommersielle databaser følger MALDI TOF MS plattformen. Disse har en rekke referansespektre av klinisk viktige sopparter. En av leverandørene tilbyr en tilleggsdatabase med filamentøse sopparter. Biblioteket avgjør sammen med proteinekstraksjon hvor god oppløsning metoden har til identifikasjon på arts og subart-nivå. MALDI TOF MS muliggjør effektive arbeidsflyt, hurtig analysetid, lave brukskostnader og til dels svært god diskriminering mellom ulike sopparter.

Standard identifikasjon av sopp benytter ekstraksjon med etanol-maursyre kombinert med en matriks, men avhengig av soppart kan man få gode spektre med ”direkte metode” og ”utvidet direkte metode”.

MALDI TOF MS er et godt hjelpemiddel for rask identifikasjon av gjærsopp fra kultur. Metoden viser også lovende resultater for å identifisere gjærsopp direkte fra positive blodkulturer. Med utvikling av bibliotekene kan metoden også forventes å kunne gi rask identifikasjon av filamentøse sopp og dermatofytter. Det er dessuten utviklet en metode for direkte påvisning av resistens mot soppmidler. Med noe utvikling kan dette bli et nyttig hjelpemiddel ved økende grad av ervervet resistens innen mykologien.

Identifikasjonen med MALDI TOF MS bør sammenholdes med morfologi og andre karakteristiske egenskaper ved isolatet.

Invasive isolat skal sendes til referanselaboratoriet for endelig identifisering, resistensbestemmelse, karakterisering og epidemiologisk overvåkning.

1.10 Resistensbestemmelse av sopp

I Norge kan rask artsbestemmelse av både gjær- og muggsopp i stor grad rettlede valg av adekvat antifungal behandling. Internasjonalt sees en økning av ervervet resistens. Det anbefales økt oppmerksomhet ved soppisolat fra gjennombrudds-infeksjoner og ved persisterende infeksjoner for å kunne oppdage resistensutvikling som igjen får betydning for valg av behandling.

Større laboratorier bør foreta resistenstesting av invasive candidaisolat med en validert kommersiell test mot flukonazol, amfotericin B og anidulafungin.

EUCAST har i de senere årene etablert brytningspunkt for de hyppigst forekommende sopparter og de fleste soppmidler. Kommersielle metoder for resistensbestemmelse av sopp er stort sett gode til å påvise resistens, men da det inngår få resistente stammer i utprøvingen av mange av testene må en anbefale årvåkenhet. Før en kommersiell test tas i bruk må den valideres, ikke alle drug-bug kombinasjoner fungerer like godt for alle testene.

Verifisering av resistensbestemmelsen skal skje på referanselaboratoriet som også identifiserer alle invasive soppisolat til artsnivå og forvalter nasjonal stammebank med samtidig mulighet for epidemiologisk overvåkning og overvåkning av resistens.

Det arbeides for at referanselaboratoriet implementerer EUCAST buljongfortynnings metode samt påvisning av de hyppigst forekommende resistensgener ved azol og echinocandinresistens. Inntil dette er på plass er det etablert et samarbeid med Statens Seruminstitut i København.

Invasive muggsoppisolat og muggsoppisolat fra pasienter på antifungal behandling bør resistensbestemmes. Pga lite prøvevolum/erfaring bør dette foreløpig kun gjøres ved referanselaboratoriet.

Alle invasive og potensielt invasive soppisolat sendes til referanselaboratoriet for å få bedre kjennskap til den epidemiologiske situasjonen i Norge. Azolresistente *A.fumigatus* med opphav i landbruket er et økende problem i pasientprøver i Europa, slike isolat er også funnet i Norge.

1.11 Serumkonsentrasjonsmålinger av soppmidler

Det er viktig at fagmiljøet har kjennskap til betydningen av serumkonsentrasjonsmålinger ved behandling med nyere azoler og flucytosin. Etter strategimøtet er det publisert britiske retningslinjer for monitorering av soppmidler. Vi har valgt å ta inn disse som rettleiding i denne rapporten. (Ashbee, H. R., et al. (2014). "Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology." *J Antimicrob Chemother* 69(5): 1162-1176.)

Valg av medikament og dosering ved optimal behandling av soppinfeksjoner må ta høyde for blant annet infeksjøs agens, medikamentinteraksjoner og ko-morbiditet som lever og nyresvikt. Biotilgjengelighet vil være avhengig av bla administrasjonsform, opptak, eliminasjon og infeksjonssted. Noen av soppmidlene doseres etter vekt og alder med korreksjon for nyrefunksjon, eller dialyse og eventuelt leverfunksjon.

Amfotericin B (alle formuleringer), flukonazol, terbinafin, kaspofungin, mikafungin og anidulafungin krever *ikke* terapeutiske konsentrasjonsmålinger for optimal dosering.

Det er etablert praksis å bruke konsentrasjonsmålinger for å tilpasse doseringen av azolene med unntak av flukonazol og for flucytosin individuelt.

Biotilgjengelighet for triazolener er mer variabel med stor variasjon i farmakokinetikk, variabel absorpsjon, metabolisering og utskillelse. Alle triazolener er substrat for et eller flere av enzymene i cytokrom P-450 systemet. Aktiviteten i disse enzymene er delvis genetisk betinget. Kjennskap til genetisk disposisjon og interaksjoner kan lette dosering, og det finnes oversikter over mange genvarianter og legemiddelinteraksjoner med forutsigbar effekt på forventet serumkonsentrasjon. For *Aspergillus* spp forutsetter følsomhetskategoriseringen at man oppnår terapeutiske serumkonsentrasjoner.

Serumkonsentrasjonsmålinger av azoler ved hjelp av massespektrometri (LC-MSxMS) OUS-Rikshospitalet*					
Antifungalt middel	Terapeutisk område: profylakse	Terapeutisk område: behandling	Toksisk konsentrasjon	Indikasjon for monitorering	Tidspunkt for prøvetaking
Vorikonazol		1-5 mg/L > 1 eller MIC ratio 2-5 bør tilstrebes. For infeksjoner med dårlig prognose bør konsentrasjoner > 2 mg/L tilstrebes.	>5-6 mg/L	Behandlingsstart Overgang fra intravenøs til peroral behandling Doseendring Terapisvikt Toksisitet	C0 Anbefales 1.å første 5 dager, deretter regelmessig
Posakonazol	0,7 mg/L	>1mg/L	Det er ikke rapportert om doseavhengige bivirkninger	Behandlingsstart GI- eller lever dysfunksjon Usikker absorpsjon eks diare Spørsmål om interaksjoner Usikker compliance, doseendringer	C 0 Anbefales etter 7 dagers behandling Noen oppgir anbefalt serumkonsentrasjon 0,38 mg/L 48 timer etter oppstart ved profylakse.
Itrakonazol	0,5 mg/L	ca 4 mg/L (0,5-4.0 mg/L ved HPLC og massespektrometri)		Svært variabel farmakokinetikk og mange interaksjoner.	1.å første behandlingsuke, deretter jevnlig
Flukonazol				Ingen	
* Prøvetaking og forsendelse ved serumkonsentrasjonsmåling av azoler: se www.anx.no Kontaktpersoner: Nils Tore Vethe og Stein Bergan (OUS, RH).					

Flucytosin brukes lite i Norge, hovedsakelig ved candidaendokarditt og kryptokokk-infeksjoner. Midlet skal ikke brukes som monoterapi og fås kun på registreringsfritak. Flucytosin har et smalt terapeutisk område og serumkonsentrasjonsmåling anbefales for å unngå toksiske konsentrasjoner og bivirkninger som benmargssuppresjon og leverpåvirkning.

- Konsentrasjonsmåling bør foretas den første uken etter oppstart hos alle pasienter, innen 72 timer hos nyfødte og ved nyresvikt.

I litteraturen opererer man med noe ulike terapeutiske områder avhengig av målemetode som benyttes. Undersøkelsen utføres med bioassay ved Mycology Reference Centre, Manchester: <http://www.mycologymanchester.org/antifungal.php>

Serumkonsentrasjonsmålinger flucytosin (Mycology Reference Centre, Manchester)		
Terapeutisk område Flucytosin		
Voksne:	Pre-dose	30-40 mg/L
	Post-dose	70-80 mg/L
Nyfødte: (<3 måneder)	Pre-dose	20-40 mg/L
	Post-dose	50-80 mg/L
Verdier >100mg/L er potensielt toksiske		

Lenker til oversikt over interaksjoner:

<http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?nac/interactions/patientchoosegeneric.php~main>

<http://www.pharmacologyweekly.com/>

1.12 Mikrobiologisk diagnostikk ved gjærsoppinfeksjoner

Invasive gjærsoppinfeksjoner domineres av ulike *Candida* spp. I Norge dominerer fortsatt *C. albicans*, etterfulgt av *C. glabrata*. *Cryptococcus neoformans* er vanligste non-Candida agens, men forekomsten av invasive non-candida arter er fortsatt lav i Norge.

Ved mistanke om invasiv gjærsoppinfeksjon er det viktig å sikre materiale til dyrkning, men gullstandardtestene blodkultur og biopsi har lav sensitivitet. Surrogatmarkører for Candida-infeksjon kan benyttes, men tilbys p.t. ikke i Norge. Bruk av genteknologiske teknikker bør tilstrebes ved negativ dyrkning fra normalt sterile områder, især ved positiv mikroskopi/histologi. Riktig blodvolum er essensielt ved blodkulturtaking og blodkulturer bør inkuberes i (5-7) dager. Vevsprøver og prøver fra sterile områder bør inkuberes lengre enn overflatekulturer. *Candida* spp isolert fra blodkultur tatt perifert eller fra CVK definerer candidemi og skal *alltid* behandles. For detaljer vedr dette vises det til andre punkter i rapporten.

Ved oppvekst av gjærsopp i blodkultur bør utsæd utføres direkte på kromskåler som inkuberes i 3 døgn. Lang inkuberingstid er viktig for kunne påvise en blandingskultur av candidaarter med ulik veksthastighet.

Rask identifikasjon er viktig rettleiding for valg av behandling. Maldi-TOF forenkler identifikasjon av gjærsopp, men identifikasjonen bør sammenholdes med morfologi og andre karakteristiske egenskaper ved isolatet. Kommersielle identifikasjonssystemer krever mer tid, men identifiserer også vanlig forekommende arter.

Fortsatt er det slik at resistensmønsteret til norske gjærsoppisolat er forutsigbart.

Naturlig (primær) resistens hos vanligste gjærsopp ovenfor midler til systemisk bruk: bearbeidet fra Bone Marrow Transplantation (2012) 47, 1030–1045							
Mikrobe	AMB	Echinocandin	Flukonazol	Posakonazol	Vorikonazol	Itrakonazol	Flucytosin
<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. glabrata</i>	S	S	I/R	S/I/R*	S/I/R*	S/I/R*	S
<i>C. parapsilosis</i>	S	I	S	S	S	S	S
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. krusei</i>	S	S	I/R	S/I/R*	S/I/R*	I/R	R
<i>C. dubliniensis</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. norvegiensis</i>	S	S	R	S	S/I	S/R	R
<i>Cryptococcus neoformans</i>	S	R	S**		S	I	S
<i>Trichosporon</i> sp	S/I/R	R	I/R	S	S	I/R	R
<i>Rhodotorula</i> sp	S	R	R	R	R	R	S

* også villtypen uten ervervet resistens er mindre følsom for azoler **heteroresistens er beskrevet

Invasive isolat skal identifiseres til artsnivå og resistensbestemmes

- Isolatene skal sendes til nasjonalt referanselaboratorium.
- Isolat fra persisterende og «recurrent» candidemi ønskes også innsendt for resistensovervåkning og karakterisering av stammer.

***Candida* spp i normalflora tillegges sjelden vekt, med noen unntak; Koloniseringsprøver fra høyrisikopasienter.**

Identifikasjon til artsnivå anbefales. Om pasienten er massivt kolonisert og har andre risikofaktorer, bør *eventuell* empirisk behandling dekke det aktuelle agens. Kolonisering *alene* er en dårlig markør for å identifisere pasienter som trenger empirisk soppbehandling, negative overvåkningskulturer har en høy negativ prediktiv verdi.

Ved øsofagitt:

Identifikasjon til artsnivå og resistensbestemmelse indisert ved opplysninger om kronisk eller komplisert infeksjon eller pågående azol-behandling.

Gjentatte funn i urin hos utvalgte pasienter (urologiske pasienter, nøydropene og pasienter på nyfødtintensiv) bør sannsynligvis også tillegges vekt.

Ved kompliserte og residiverende vaginitter og ved forutgående azolbehandling utføres identifikasjon til artsnivå og resistensbestemmelse mot flukonazol, som er det eneste anbefalte perorale middel ved tilstanden. Nyttan av resistensbestemmelse mot lokale midler er omdiskutert. (se *Strategirapport 2010*, side 14).

Alle laboratorier må:

- Identifisere og skille mellom *C. albicans* og andre *Candida* spp
- Påvise *Cr. neoformans* (spinalvæske, blod, BAL, urin, hudlesjoner)
 - Kryptokokk hurtigst og/eller mikroskopi med tusj eller Calcofluor white og forlenget inkubering mtp kryptokokker anbefales. Selektiv agar fra BAL og områder med normalflora.

Alle laboratorier bør:

- Gjenkjenne vanligst forekommende isolat med kjent resistensprofil som får betydning for behandlingsvalg.
 - Flukonazol: *C. glabrata* (I eller R) og *C. krusei* (R)
 - Helst kunne utelukke *C. parapsilosis* mtp unødig echinocandinbehandling.

Alle sykehus med større hematologiske avdelinger bør:

- Utføre artsidentifikasjon ila 2 døgn
- MALDI-TOF forenkler identifikasjon av gjærsopp.
- Utføre resistensbestemmelse mot flukonazol, Amfotericin B og anidulafungin med en validert test

1.13 Mikrobiologisk diagnostikk ved muggsoppinfeksjoner

I Norge er *A. fumigatus* hyppigste agens, men en ser også infeksjoner med andre *Aspergillus* arter som *A. flavus* og *A. terreus*. *Aspergillus niger* er hyppig årsak til ekstern otitt og sees også ved aspergillomer. Andre viktige slekter/arter er Mucorales/Entomophthorales (gir zygomycosis, mucormycosis), *Fusarium*, *Acremonium*, *Pseudallescheria boydii*/*Scedosporium apiospermum*. Også invasive infeksjoner domineres av *A. fumigatus* og andre

aspergillus-arter, men infeksjoner forårsaket av tidligere meget sjeldne arter øker. Rask tilbakemelding til kliniker ved oppvekst er viktig.

1.13.1 Når skal en mistenke muggsoppinfeksjon

Sykdom hos immunsvekkede med grav nøythropeni, men også hos andre immunsvekkede som transplanterte (obs benmarg), ved GVHD, CMV infeksjon, steroidbehandling, HIV og ulike medfødte immunsviktsykdommer, se oversikten foran.

Funn av muggsopp i prøve fra immunsupprimert pasient skal **alltid** rapporteres. Kliniker må vurdere om funnet er reelt ved å sammenholde med klinikk og radiologiske funn, eventuell mikroskopi/histologi og eventuelt ta nye prøver (unntak *Penicillium* sp).

Det er vanskelig å skille kolonisering fra infeksjon i luftveier. Funn av muggsopp bør identifiseres og rapporteres hos pasienter på respirator, ved allergisk bronkopulmonal aspergillose (ABPA), aspergillom, astma, CF og hos pasienter på steroider.

Vekst av muggsopp i blodkultur sees kun for sopp som sporulerer i vev (*Fusarium*, *Acremonium*). Oppvekst av *Aspergillus* og *Mucorales* i blodkultur kan forekomme hos terminale pasienter, men er vanligvis forurensning.

For *sikker* diagnose kreves funn av hyfer i vev med vevsskade eller vekst av muggsopp fra prøve tatt ved steril prosedyre fra normalt sterilt område.

Sensitiviteten er lav og oppvekst i ikke-sterilt materiale er en viktig indikasjon på infeksjon hos risikopasienter.

Bruken av antigenester og PCR som surrogatmarkører for sannsynlig eller mulig infeksjon er økende.

Tidlig klinisk mistanke og empirisk behandling bør søkes verifisert ved adekvat diagnostikk som innebærer samarbeid med radiologer, patologer, mikrobiologer og infeksjonsmedisinere.

1.13.2 Krav til identifikasjon ved primær laboratorium

Ved invasiv sykdom viktig med identifikasjon helst til artsnivå, siden det gir opplysninger om behandlingsvalg.

i. I ulike prøvematerialer

Fra sterile områder og hos immunsupprimert: identifisere til artsnivå

Fra ikke sterile områder og overflateinfeksjon: tilstrekkelig med identifikasjon til slektsnivå.

Ved gjentatte funn av samme art muggsopp ved ABPA, KOLS og CF kan funnet ha klinisk betydning og identifikasjon og resistenstesting er indisert.

Hvis et funn oppfattes som forurensning kan det besvares uten nærmere identifikasjon som muggsopp.

ii. Metoder

Konvensjonelle metoder:

Makroskopisk morfologi. Koloniutseende (form, farge, størrelse) bakside og forside.

Mikroskopisk morfologi (bomullsblått, bruk av stereomikroskop). Hyfer med og uten septa, forgreining, parallelle/ikke parallelle hyfevegger. Pigmenthyfer og/ eller konidier.

Konidiogenese, utseende og størrelse av makrokonidier og mikrokonidier,

Dyrkningsbetingelser: vekst ved forskjellige temperaturer, vekst på spesialmedier

”Hurtig -id” av *A. fumigatus*: grønn på Sabouraud, vekst ved 45 °C, typiske hoder ved mikroskopi.

«Nye» metoder:

Maldi-Tof og nukleinsyre påvisning se 1.8 og 1.9.

1.13.3 Konklusjon

Korrekt forbehandling og håndtering av prøvematerialet viktig for optimalt dyrkningsresultat:

- Biopsier må skjæres IKKE mortres
- Seigt prøvemateriale bør forbehandles, f. eks. med dithiotreitol.
- Oppkonsentrering ved sentrifugering ($\geq 1000g$ i minst 10 min.) anbefales for prøvemateriale i væskeform.
- For mikroskopi kan materiale avsettes på objektglass manuelt eller ved hjelp av cytospin sentrifuge.

Optimale dyrkningsbetingelser er viktig for å øke det diagnostiske utbyttet:

- to temperaturer
- selektive soppskåler
- forlenget inkubasjonstid

Oppvekst av muggsopp

- Vurder pasientkategori og kliniske opplysninger før funnet rapporteres som muggsopp og forurensning.
- Funn av muggsopp i prøve fra immunosupprimert pasient skal *alltid* rapporteres

Primærlaboratoriene:

- bør identifisere muggsopp fra sterile områder og fra immunosupprimerte pasienter til artsnivå ved hjelp av makroskopisk utseende, mikroskopi og vekst ved forskjellige temperaturer.
- Tilsvarende ved funn fra ikke sterile områder ved andre tilstander som CF eller ABPA hvor antimykotisk behandling igangsettes.
- Isolatene sendes til Referanselaboratorium for verifisering av identifikasjon og resistensbestemmelse.

Det er fortsatt viktig å sammenholde molekylær diagnostikk med morfologi og mikroskopi.

1.14 Diagnostikk ved *pneumocystis jirovecii* infeksjoner

Pneumocystis jirovecii forårsaker alvorlig pneumoni hos pasienter med svekket T-celleimmunitet. De fleste smittes av *P. jirovecii* før 2-4 års alder sannsynligvis som subklinisk infeksjon eller som en banal luftveisinfeksjon. Enkelte autopsifunn fra lunge tyder på at *P. jirovecii* er vanlig i befolkningen, mens andre studier av immunkompetente individer ikke har påvist tilstedeværelse av *P. jirovecii* DNA. Pneumocystis-pneumoni hos immunosupprimerte skyldes sannsynligvis luftsmitte fra koloniserte personer eller andre pasienter med pneumocystis-pneumoni. En rekke utbrudd av pneumocystis-pneumoni i sykehus blant immunosupprimerte er beskrevet.

Pneumocystis-pneumoni er beskrevet

- Hos premature og underernærte barn
- Som opportunistisk infeksjon ved HIV.
 - Etter innføringen av moderne HIV-behandling i vår del av verden har antall tilfelle med pneumocystis-pneumoni hos HIV-positive falt betydelig.
- Hos organ- og stamcelletransplanterte pasienter
- Hos pasienter med malign sykdom (særlig maligne blodsykdommer)
- Hos pasienter som får immunosuppressiv behandling.
 - Forekomsten av pneumocystis-pneumoni i HIV- negative pasientgrupper synes å øke.

Sykdommen hos HIV-negative pasienter har

- mer akutt forløp
- kraftigere inflammasjon
- høyere letalitet.

1.14.1 Aktuelle undersøkelser og egnet prøvemateriale

(i) kjemiske fargemetoder som viser soppementenes (spesielt cystenes) morfologi ved mikroskopi.

(ii) immunmorfologiske fargemetoder med merkede antistoffer som er spesifikke for *P. jirovecii* antigener, gjerne i form av immunfluorescensmikroskopi.

(iii) påvisning av *P. jirovecii* DNA ved PCR (eller andre molekylære metoder).

Til mikroskopi: Bronkial skyllevæske anbefales. Indusert sputum kan aksepteres, men har lavere sensitivitet. Lungebiopsi er akseptabelt.

- Seigt prøvemateriale bør forbehandles, f. eks. med dithiotreitol.
- Oppkonsentrering ved sentrifugering ($\geq 1000g$ i minst 10 min.) anbefales for prøvemateriale i væskeform.
- For mikroskopi kan materiale avsettes på objektglass manuelt eller ved hjelp av cytospin sentrifuge.

Påvisning av *P. jirovecii* DNA: Bronkial skyllevæske, indusert sputum og lungebiopsi er anbefalte prøvematerialer. *P. jirovecii* DNA kan også påvises i lettere tilgjengelige prøvematerialer som munnskyllevann ved PCR.

Pneumocystis-diagnostikken er nå i stor grad rettet mot immunsupprimerte som er HIV-negative.

Dette stiller økte krav til sensitiv diagnostikk, samtidig som man må søke å skille infeksjon fra kolonisering

- Ved PCR-undersøkelse vil negativt resultat ha høy prediktiv verdi.
- Høy DNA-konsentrasjon vil tale for infeksjon mens lav DNA-konsentrasjon vil tale for kolonisering.

Basert på tilgjengelig litteratur anbefales det å kombinere immunmorfologisk metode med PCR-diagnostikk, der det gjøres en semikvantitativ eller kvantitativ vurdering av mengden av Pneumocystis-DNA.

- Diagnostisk kan en primært utføre immunmorfologisk metode, og ved negativt funn gjøre (semi)kvantitativ PCR

- Alternativt kan det primært settes opp PCR, dernest immunmorfologisk metode ved positiv PCR (evt positiv PCR over definert grenseverdi ved bruk av (semi)kvantitativ metodikk).

Laboratoriet bør gjøre en samlet vurdering av funnene og kommentere sannsynlighet for infeksjon, henholdsvis kolonisering.

Betydningen av β -glukan i serum som tilleggsundersøkelse ved spørsmål om pneumocystis-pneumoni er pt. uavklart. Det er mulig at denne analysen kan bidra til å skille kolonisering fra infeksjon med *P. jirovecii*. Dette bør studeres nærmere i form av prosjekt, helst med deltakelse fra flere laboratorier.

1.15 Mikrobiologisk diagnostikk av endemiske mykoser

Endemiske mykoser forårsaket av dimorfe sopper (se kapittel 1.16 for en liste over aktuelle sopparter) kan gi infeksjon hos immunfriske og immunsvekkede, men påvises sjelden i Norge. Importerte infeksjoner sees som regel etter reise til endemisk område. Kan også sees hos immunsupprimerte som reaktivert infeksjon etter tidligere opphold i endemisk område. Alvorlighet av sykdom er relatert til smittedose og vertsfaktorer.

De fleste dimorfe sopparter tilhører smitterisikogruppe 3 og mange vil velge å så ut prøvene og å håndtere dem i P3 lab, se avsnitt 1.16 om laboratoriesikkerhet.

Mikrobiologisk diagnostikk er basert på:

Påvisning av typisk utseende gjærsoppformer av de dimorfe soppene ved direkte mikroskopi

- Calcofluor white/blankophor + Kalilut (KOH).
- Giemsa-farget blodutstryk/ beinmarg.
- Histopatologi (viktig)

Dette kan gi grunnlag for korrekt videre håndtering i lab og behandling av pasienten.

Dyrkning

- Sterilt materiale på Sabouraud SDA og BHI agar ved både 25-30° C og 35-37° C.
- Usterilt materiale på SDA og BHI ved både 25-30° C og 35-37° C+ tillegg av medier med kloramfenikol ved 25-30° C og 35-37° C, samt medier med både cycloheximide og kloramfenikol ved 25-30 grader.
- Isolatorsystem er godt egnet for påvisning av coccidioidomykose og histoplasmose i blod, men benyttes lite i Norge.

Skålene dyrkes i inntil 6 uker. Rask utsæd etter prøvetakning viktig for overlevelse.

Veksthastighet variabel, men oppvekst kan som regel forventes innen 1-2 uker.

Identifikasjon

- Sekvensering av ITS-området på unge kulturer (utføres på Referanselaboratoriet) kan gi rask identifikasjon før isolatet har utviklet en typisk morfologi. Kultur sendes på Amies medium. Kategori A biologisk materiale.
- Morfologisk identifikasjon av koloniutseende på skål og ved mikroskopi med lactophenol cotton blue (LPCB).
- OBS aldri «slide culture» av P3 organismer. «Tease» preparat med inokulasjonsnåler er å foretrekke fremfor tape preparat pga mindre mengde konidier og bedre kontroll med at alt materialet blir dekt av LPCB.
- Demonstrere termal dimorfisme (fra mugg til gjærsoppfase). Ikke alltid mulig og tar tid. Bruk evt. BHI agar til dette.

Serologi

- Antistoffundersøkelse med immundiffusjonstest er tilgjengelig på Referanselaboratoriet. Nyttigst hos immunfriske ved akutt histoplasmose og ved coccidioidomykose.
- Antigentester er ikke tilgjengelig i Norden per i dag.
- Positiv Galaktomannan i serum pga kryssreaksjon er beskrevet ved penicillinose, histoplasmose og blastomykose.

1.16 Laboratoriesikkerhet ved håndtering av smitterisikogruppe 3 agens i mykologien

Oppsummering og anbefaling:

For generelle smittevernrutiner i laboratoriet henvises til tidligere strategirapport (1999). Innen mykologien er dannelse av aerosol eller inhalasjon av konidier især fra kulturer med *Coccidioides immitis* og *Histoplasma capsulatum* i muggfasen fryktet som årsak til laboratoriesmitte. Det foreligger også rapporter om inokulasjonssmitte ved håndtering av prøver eller kulturer. Smitte rapporteres også fra lavendemiske områder, ofte i forbindelse med uventet funn av dimorf sopp. Økende reisevirksomhet og økende antall immun-supprimerte pasienter gjør at slik smitte også kan inntreffe i Norge. Reiser til endemiske områder i USA, men også mer eksotiske reisemål kan medføre smitte og latent sykdom, også hos ellers friske pasienter. Akutt sykdom forekommer i forbindelse med massiv eksponering eller ved reaktivering i forbindelse med senere immunsuppresjon.

Faren for laboratorieuhell er størst om man ikke har laboratorierutiner som tar høyde for potensiell smitterisiko.

Sopp i smitterisikogruppe 3 der luftbåren smitte ikke er utelukket ¹	
Sopp	Smitte
<i>Blastomyces dermatitidis</i> (<i>Ajellomyces dermatitidis</i>)	Inhalasjon. Inokulasjon. Smitte mellom mennesker er sjelden. Laboratoriesmitte (inhalasjon, inokulasjon)
<i>Cladophialophora bantiana</i> (<i>Xylohypha bantiana</i> , <i>Cladosporium bantianum</i>)	Fra jord/planter. Ikke kjent om det smitter mellom mennesker
<i>Coccidioides immitis/posadasii</i>	Fra jord. Inhalasjon av støv. Inokulasjon Laboratoriesmitte (inhalasjon, inokulasjon)
<i>Histoplasma capsulatum</i> var <i>capsulatum</i> (<i>Ajellomyces capsulatus</i>)	Inhalasjon av jord/støv forurenset med avføring fra fugler eller flaggermus. Laboratorieinfeksjon (inhalasjon, inokulasjon)
<i>Histoplasma capsulatum duboisii</i>	Fra jord. Inhalasjon av støv. Laboratorieinfeksjon (inhalasjon, inokulasjon)
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Fra jord. Inhalasjon. Smitter ikke mellom mennesker. Gir ikke laboratorieinfeksjon

Penicillium marneffei og *Sporothrix schenckii* er dimorfe sopparter som kategoriseres som smitterisikogruppe 2.

Dannelse av aerosoler er en viktig årsak til laboratoriesmitte og kan inntreffe i forbindelse med homogenisering, vibrasjoner (vortex-mikser), sentrifugering, pipettering, flamme-fiksering av preparater, katalasetest, agglutinasjon, frysesnitt og åpning av skåler med mycel. For muggsopp og dimorf sopp i muggstadiet er inhalasjon av konidier viktig smittekilde.

Fornuftig bruk av sikkerhetskabinett og riktig inneslutningsnivå vil minimere fare for laboratoriesmitte, men tiltakene må være hensiktsmessige slik at de følges i den daglige rutinen. Det vil også være hensiktsmessig å ha prosedyre for håndtering av potensiell laboratoriesmitte.²

Det er ikke automatisk samsvar mellom smitterisikogruppe og inneslutningsnivå, og internasjonale anbefalinger er ikke helt identiske.

Håndtering av prøvemateriale ved mistanke om dimorfe sopp

- Inneslutningsnivå 2*

* ved mistanke om dimorf sopp vil mange laboratorier vil velge å håndtere prøvematerialet i P3lab

Håndtering av muggsopp

- Mikrobiologisk sikkerhetskabinett klasse 2

Håndtering av kultur med dimorfe sopp

- Inneslutningsnivå 3.
- Drep kulturen før den blir gammel (innen 7d)

Hvordan redusere smitterisiko

Kulturer med muggsopp

- Alltid tapede skåler.
- Åpning i sikkerhetskabinett klasse 2 (1?)
- Dersom man uforvarende åpner en skål med vekst av muggsopp på benk, skal skålen straks lukkes og flyttes til et sikkerhetskabinett.
- Skåler som tas vare på i mer enn 3 dager ved romtemperatur skal tapes.
- Ved sterk mistanke om dimorf sopp anbefales dyrkning i rør med skråagar og skrukork (mindre overflate/ konidier).

Inaktivering av konidier

- Bomullsblått (lactophenol cotton blue) inneholder 20 - 25 % (2 - 2,5 mg/ml) fenol (C₆H₅OH) som har antimykotisk effekt.
- Mange anbefaler å spre ut prøvematerialet i 70 % alkohol før bomullsblått blandes inn.
- Det anbefales **ikke å** lage «slide culture» av P3 organismer.
- «Tease» preparat med inokulasjonsnåler er å foretrekke over tape preparat pga mindre mengde konidier og bedre kontroll med at alt materialet blir dekket av lactofenolbomullsblått.
- Obs det finnes bomullsblått uten lactophenol!

Referanser:

1. http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/bmbl5_sect_viii_b.pdf
2. Stevens DA, Clemons KV, Levine HB et al. Expert opinion: What to do when there is *coccidioides* exposure in the laboratory. CID 2009; 49: 919-23.

1.17 Mikrobiologisk diagnostikk ved dermatofyttinfeksjoner

- PCR kan erstatte dyrkning og direkte mikroskopi dersom en tar høyde for valgte metodes svakhet og lager en prøvflyt og besvaring som ivaretar dette.
- Ideelt sett bør gjentatte PCR negative prøver mikroskoperes og dyrkes.
- Direkte mikroskopi
 - Bør utføres på alle prøver som dyrkes mtp dermatofytter,
 - Resultatet bør gis ut før dyrkning er ferdig
 - KOH-Calcofluor White
- Dyrkning bør utføres på alle prøver til:
 - Sabouraud eller tilsvarende med kloramfenikol
 - Sabouraud eller tilsvarende med kloramfenikol og cycloheximid
 - Inkubering i minst 2 uker (minst 3 uker uten mikroskopi)
 - Temperatur 26-30 grader (28).
 - Atmosfære: Romluft
- Lokalt bør en minimum kunne identifisere de vanligste artene (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. violaceum*, *M. canis*, *E. floccosum*)
 - Tradisjonelle fenotypiske metoder
 - MALDI-TOF
- Videre identifikasjon ved MALDI-TOF eller sekvensering
 - Egen lab
 - Regionlaboratorium
 - Unntaksvis kan dermatofytt-stammer sendes til referanselaboratoriet.
- Funn av non-dermatofytt, spesielt i negleprøver, bør vurderes mot direkte mikroskopi og anbefaling om ny prøve for repetering av funn.
- Krav til identifikasjon ved funn av non-dermatofytt varierer utfra hvert enkelt funn og resultat av mikroskopi. Helst til genusnivå.
- Svarutgivelse som vekst av muggsopp og/eller gjærsopp bør unngås, spesielt dersom det ikke utføres mikroskopi.

1.18 Nasjonalt referanselaboratorium

Nasjonalt referanselaboratorium for medisinsk mykologi (NRMM) har ansvar for identifikasjon og resistensbestemmelse av invasive soppisolat, med særskilt ansvar for oppfølging og overvåking av invasive Candida-infeksjoner.

NRMM er en del av Helse Sør-Øst sitt regionale nettverk "Invasive fungal infections: epidemiology, resistance mechanisms and host-pathogen interactions".

Referanseundersøkelsene utføres ved Sopplaboratoriet, Bakteriologisk seksjon, OUS-Rikshospitalet.

Sopplaboratoriet ligger under Bakteriologisk seksjon og samarbeider både med Bakteriologisk seksjon og med Enhet for Virologi og infeksjonsimmunologi (VIM) om andre soppanalyser.

NRMM - se egen nettside: www.mykologi.no

Innsending av invasive Candida-isolat

Alle invasive Candida-isolat skal sendes inn for identifikasjon og resistensbestemmelse. I Norge har vi gjennom år opparbeidet en unik stammebank med Candidemi-isolat med mulighet for epidemiologisk overvåking og karakterisering av stammer.

Vi ønsker økt oppmerksomhet på og overvåking med tanke på resistensutvikling under pågående behandling. I tillegg til alle nye Candida-isolat ønskes det også at gjentatte Candida-isolat sendes referanselaboratoriet hvis det er >7 dager mellom prøvetakingstidspunktene.

Innsending av andre fungemi-isolat.

Alle fungemi-isolat og andre invasive soppisolat skal sendes inn for identifikasjon og resistensbestemmelse.

Vurdering og innsending av ikke-invasive Candida-isolat

Identifikasjon til artsnivå og resistensbestemmelse er indisert ved opplysninger om kronisk eller komplisert infeksjon eller pågående azol-behandling. F. eks. ved øsofagitt, cystitt hos utvalgte pasientgrupper, koloniseringsprøver fra pasienter med særlig høy risiko for invasiv soppinfeksjon. Vurderingen av normalflora eller mulig infeksjon er ikke alltid entydig. Om ikke identifikasjon og resistensbestemmelse av slike isolat utføres lokalt kan isolatet sendes til referanselaboratoriet

- Ved funn av uventet resistens bør funnet verifiseres ved referanselaboratoriet

Gjærsopp i vaginalprøver

Problemer knyttet til funn av gjærsopp i vaginalprøver ble lite berørt på strategimøtet som hadde hovedfokus på invasive infeksjoner. Vurderingen av normalflora vs infeksjon er ikke alltid entydig og tematikken ble heller ikke omtalt i særlig grad i Strategirapport 2010 (Mikrobiologiske undersøkelser ved underlivsinfeksjoner).

Håndtering av Candida i vaginalprøver kunne trenge en egen gjennomgang da vellykket behandling ikke støtter seg på bruk av antifungale midler alene, og mange mener resistensbestemmelse av disse isolatene ikke speiler behandlingseffekt ut i fra lokale forhold som pH og bruk av lokale midler. Tidligere er det konkludert med at resistensbestemmelse skal utføres mot flukonazol, og dette bør utføres lokalt.

Innsending av muggsoppisolat

Det ønskes økt fokus på invasiv eller mulig invasiv muggsoppinfeksjon og forekomst av azolresistens. Det er viktig å sende inn isolater for at vi skal få nasjonal oversikt over muggsoppinfeksjoner.

- Alle muggsopp-isolater fra sterile områder hvor disse tillegges diagnostisk verdi skal sendes til referanselaboratoriet.
- Funn fra ikke sterile områder innsendes også fra pasienter med alvorlig immunsuppresjon om funnet tillegges vekt og ved andre tilstander som CF eller ABPA hvor antimykotisk behandling igangsettes.

Resistensbestemmelse av muggsopp-isolat

- Resistensbestemmelse utføres på isolater fra normalt sterile områder og hos pasienter hvor soppbehandling er indisert.
- Det er bare etablert brytningspunkter for noen *Aspergillus* spp.
- MIC-bestemmelse og identifikasjon gir god behandlingsveiledning.

Hva bør *ikke* sendes til identifikasjon

- Isolat fra overflatiske infeksjoner (ekstern otitt, hud, hår, negl)
- Koloniseringsprøver når behandling ikke er indisert. Evt. fryse isolatet ned lokalt.

Identifikasjon av dermatofytter:

Referanselaboratoriet er behjelpelig med identifikasjon av dermatofytter. Dette arbeidet tar ofte lang tid da stammene vokser sent.

- Det oppfordres til et samarbeid om en dermatofyttdatabase i til bruk i MaldiTOF som kan løse problemet lokalt eller regionalt uten å belaste referanselaboratoriet.

Referanselaboratoriet merker økende pågang for å få utført resistensbestemmelse av ikke-invasive soppisolat, ofte uten opplysninger om indikasjon for undersøkelsen.

Referanselaboratoriet tilbyr følgende genteknologiske tester direkte på prøvematerialet i samarbeid med Bakt.lab:

- Påvisning av *P. jirovecii* DNA
- Påvisning av *A. fumigatus* DNA
- Påvisning av *Aspergillus* spp DNA
- Påvisning av Mucorales (Zygomycetes) DNA
- Dermatofytt PCR
- Påvisning av sopp-DNA og sekvensering
 - ITS2 og D1D2Utføres vanligvis ikke på materialer der (gjær)sopp inngår i normalfloraen

Metode for påvisning av azolresistens hos *A. fumigatus* er innført høsten 2015
Vi ønsker også å utvide diagnostikken med påvisning av Candida DNA.

Referanselaboratoriet tilbyr følgende mikroskopimetoder i samarbeid med Bakt.lab:

- Pneumocystis IF-mikroskopi
 - Ved behov ved positiv PCR i BAL, indusert sputum eller biopsi (unntatt svakt positive)
- Calcofluor-white mikroskopi direkte på biopsi/BAL/aspirat/puss/vev
 - Ved behov

Referanselaboratoriet tilbyr følgende serologiske tester og antigenester:

- Galaktomannan
 - 3 ganger per uke (VIM)
Telefonbeskjed til rekvirent ved positiv indeks der telefonnummer er oppgitt på rekvisisjonen.
- Kryptokokk antigen med titrering (Sopplab)
 - daglig
Telefonbeskjed til rekvirent ved positiv prøve der telefonnummer er oppgitt på rekvisisjonen.
- Antistoffundersøkelse med immundiffusjonstest (presipiterende antistoff) mot *Aspergillus fumigatus* (Sopplab)
 - ved behov/x 1 pr uke
- Antistoffundersøkelse med immundiffusjonstest mot dimorfe sopparter.
 - ved behov (Sopplab)
Best egnet hos immunfriske ved akutt histoplasmose og ved coccidioidomykose.

Vi ønsker også å utvide diagnostikken med påvisning av 1,3- β -D-glukan.

Referanselaboratoriet ønsker å tilby EUCAST buljongfortynning:

Referanselaboratoriet har startet arbeidet med å implementere resistensbestemmelse med EUCAST buljongfortynning som referansemetode både ved uventet resistens og for epidemiologisk overvåkning. I tillegg ønsker vi å kunne tilby påvisning av resistensgener i invasive *Candida*-isolat.

Inntil dette er på plass er det etablert et samarbeid med Statens Serum institutt i København for verifisering av uventet resistens.

2 INNLEGGENE PÅ MØTET

2.1 Medisinsk mykologi- hva forventer klinikerne av laboratoriene i 2013

Ingvild Nordøy, Seksjon for klinisk immunologi og infeksjonssykdommer, OUS Rikshospitalet

Invasive soppinfeksjoner er av de infeksjonene vi frykter mest pga høy dødelighet. Disse rammer primært immunkompromiterte pasienter, eller pasienter som har kompliserte sykehusopphold. På verdensbasis er den viktigste årsak til invasive soppinfeksjoner *Candida* sp. (1). I USA er *Candida* sp. det 4. vanligste blodkulturfunn på sykehus (2). Hos barn er de den 3. vanligste årsak til alvorlig infeksjon med positive blodkulturer både i USA og i Europa (3, 4). Forekomsten av invasive infeksjoner øker på verdensbasis og særlig forekomsten av candidemier (5,6).

I Norge er de invasive soppinfeksjonene fortsatt overveiende forårsaket av *Candida* sp., dernest *Aspergillus* arter. Andre sopparter kan også gi invasiv infeksjon, men forekommer svært sjeldent. I Norge er *C. albicans* fremdeles den dominerende årsak til invasive *Candida* infeksjoner (8,9).

Invasiv soppinfeksjon har oftest utgangspunkt i sopp fra gastrointestinaltraktus eller luftveiene. Under gitte betingelse vil en kolonisor bli invasiv og derfra kunne spres hematogent til andre organer. For en kliniker er det et hovedproblem at invasiv soppinfeksjon gir helt uspesifikke symptomer. Diagnostisk verktøy for rask og spesifikk diagnose mangler. Selv om vi de siste 20 årene har fått flere behandlingsalternativer, vet vi enda ikke om dette faktisk har redusert dødeligheten ved disse infeksjonene. Studier viser dog at det er av betydningen å starte riktig behandling tidlig, og vi ender derfor ofte opp med empirisk behandling som kan medføre bivirkninger og vanskeliggjøre annen behandling, da flere soppmidler interagerer til dels betydelige med andre medikamenter (7). Denne behandlingen er også svært kostbar.

Fra en klinikers ståsted er det ønskelig raskt å få avklart om det dreier seg om en soppinfeksjon. Tester som har høy negativ prediktiv verdi vil også være til hjelp for å unngå potensiell overbehandling. Diagnostikk som raskt påviser soppinfeksjonen, vil kunne hjelpe oss å starte målrettet behandling tidlig.

Referanser:

1. Rueping M J, Vehreschild JJ, Cornely OA. Invasive candidiasis and candidemia: from current opinions to future perspectives. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18:735–748. .
2. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004;39:309-17.
3. Wisplinghoff H, Seifert H, Tallent SM, et al. Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients in United States hospitals: epidemiology, clinical features and susceptibility. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:686-691
4. Raymond J, Aujard Y. Nosocomial infections in pediatric patients: a European multicenter prospective study. European Study Group. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;21:260-263.
5. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;37:634-43.
6. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:133–163.
7. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3640-45.

8. Sandven P, Bevanger L, Digranes A, Haukland HH, Mannsaker T, Gaustad P, and the Norwegian Yeast Study Group. Candidemia in Norway (1991 to 2003): Results from a nationwide study. J Clin Microbiol 2006;44: 1977–1981.

9. Nordøy I, Gaustad P, Sandven P, and the Norwegian Yeast Study Group. Candidemia in Norway, a 5 year follow-up of a nationwide study. Mycoses 2009;52: (Suppl. 1) 66-67.

2.2 Sopp i blodkultur

Liv Hesstvedt, Mikrobiologisk avdeling OUS Rikshospitalet

Blodkulturer og sopp – Hovedsakelig Candida sp., og 70 % av det igjen er *C.albicans*. *C.glabrata* forekomst i Norge er stabilt lav på 13-15 %. Insidensen av fungemi de siste 10 år er fortsatt lav, på ca. 3-4 / 100 000 innbyggere. På verdensbasis derimot, ser man en betydelig økning av antall candidemier og økende forekomst av non-albicans fungemier. Mortaliteten er uendret høy, på tross av nye antifungale midler de siste 10 år. Forekomst av kryptokokker og dimorfe sopp i blodkulturer er svært sjelden.

1. BLK systemer

Automatiserte blodkultursystemer med kontinuerlig overvåkning er nå innført ved alle mikrobiologiske laboratorier i Norge. Ved 13 laboratorier bruker man nå **Bactec** (Beckton Dickinson Microbiology Systems), mens ved 11 laboratorier bruker man **BacT/Alert** (BioMerieux) etter undersøkelse fra 2013. De to systemene synes omtrent like gode for påvisning av bakterier, mens det de senere år er det påvist forskjeller ved påvisning av *Candida* sp. og ved dobbeltinfeksjoner med sopp og bakterier. Forskjellene kommer tydeligere frem ved bruk av det tradisjonelt benyttede blodkultursettet med aerob + anaerob flaske.

ISOLATOR blodkultur system er fortsatt tilgjengelig, i tillegg til de to overnevnte systemer, ved noen laboratorier i Norge. Systemet er kjent for å være pålitelig og bra for påvisning av sopp, og klart best ved påvisning av Histoplasma .

(Strategimøte nr.16, Blodkultur, 2002, Sandven, Vetter 2001)

Et dilemma er lav deteksjonsevne ved begge automatiserte systemer. Undersøkelser av terminalt utsæd av negative blodkulturflasker viser oppvekst av *candida* sp., og har avdekket flere falskt negative blodkulturer.

(Horvath 2003, 2004, UK standards of Microbiology Investigations 2013)

Evaluering av de 2 overnevnte automatiserte systemer er gjort og publisert de senere år.

1. Generelt ved candidemier (aer + ana flaske) **BacT/Alert > Bactec**
(Horvath 2004, Arendrup 2011, 2012, Klingspor 2012)

2. Generelt ved candidemier (aer + ana + **mycosis flaske**) **BacT/Alert = Bactec**

(Horvath 2004)

2. Blodkulturmedier og inkubasjonstid av blodkulturflasker

Standard Medium Bactec system:

Bactec Plus Aerobic/F, Bactec Plus Anaerobic/F, Bactec Peds Plus:

Bactec Myco/F Lytic: Inneholder saponin (lyserer) gjærekstrakt og karbohydrater

Bactec Mycosis IC/F: Innh. saponin (lyserer), gjærekstrakt karbohydrater, kloramfenikol og tobramycin

Standard Medium BacT/Alert system:

BacT/Alert FA, BacT/Alert FN og BacT/Alert Pediatric

Inkubasjonstid -Generelle retningslinjer:

Inkubasjonstid varierer fra laboratorium til laboratorium. De fleste inkuberer minimum i 5 dager, mange forlenger til 7 dager, 14 dager eller mer, ved klinisk mistanke om langsomt voksende mikrobe eller invasiv soppinfeksjon. Gjærsopp kan vanligvis påvises innen 72 timer (unntatt *C.glabrata*), mens det kan gå 3-6 uker før oppvekst av dimorf sopp.

Medium	Bruksområde	Inkubasjonstid	Bemerkning
Bactec Plus Aerobic/F	-bakterier og sopp	5-7 dager	1
Bactec Plus Anaerobic/F	-bakterier og sopp	5-7 dager	1
Bactec Mycosis IC/F	-selektivt for gjærsopp - ikke dimorfe sopp ²	5-7 dager	1
Bactec Myco/F Lytic	- ikke-selektivt for sopp og mycobakt.	7, 30 og 42 dager for mycobact.	1
Bactec Peds Plus	-barn; bakterier / sopp	5-7 dager	1
BacT/Alert FA (aerob)		5-7 dager	1
BacT/Alert FN (anaerob)		5-7 dager	1
BacT/Alert Pediatric	-barn; bakterier / sopp	5-7 dager	1

¹ forlenge inkubasjon ved behov

² iflg. BD (Beckton Dickinson) produktinformasjon

Evaluerings av de 5 ulike blodkulturmediene er gjort og publisert de senere år.

1. **FØR** antifungal behandling gitt: **Bactec Mycosis IC/F = BacT/Alert FA**
(Ericson 2012)
2. **ETTER** antifungal behandlingstartet:
Bactec Mycosis IC/F < BacT/Alert FA < Bactec Fx Plus Aerobic/F
(Ericson 2012, Jekarl 2012)
3. Fungemier med *C.glabrata*: **Bactec Mycosis IC/F > BacT/Alert FA**
(Horvath 2004, Ericson 2012)
(Strategimøte nr.16, Blodkultur, 2002/ Endring 2004, Sandven)
4. Dobbelte infeksjoner med sopp og bakterier: **Bactec Mycosis IC/F > BacT/Alert FA**
(Chiarini 2008, Meyer 2004)
5. Infeksjoner med *Fusarium* sp *Malazzesia* sp., kryptokokker and *C.guillermonti*:
Bactec Mycosis IC/F > Bactec Plus Aerobic/F
(Meyer 2004)

Påstand:

- De som har Bactec system **bør legge til Bactec Mycosis IC/F flaske, alt. Myco/F Lytic**
→ DA er Bactec = BacT/Alert mtp sopp- påvisning
- Vurdere **øke** inkubasjonstiden til 7 dager mtp *C.glabrata*
- Vurder **terminal utsæd** ved klinisk mistanke om sopp infeksjon **UTEN** positiv blodkultur.

3. Blod mengde og valg av medier

Medier: **Et blodkultursett** er definert som blodkultur tatt ved **ett innstikk:**

(Tradisjonelt 1 aerob + 1 anaerob flaske)

Anbefalinger :

→ **3 flasker** (aerob/ anaerob/ soppflaske) ved anleggelse av blodkultur
(ESCMID Guideline 2012, Denning 2003)

→ **2 flasker** (aerob + anaerob) ved anleggelse av blodkultur

+ **Tillegg av Mycosis IC/F flaske** der det klinisk er mistanke om soppinfeksjon og evt. ved enkelte avdelinger / pasientgrupper: Hematologisk-, Intensiv- og Infeksjonsmedisinsk avdeling.

(Strategimøte nr.16, Blodkultur, 2002/ Endring 2004, Sandven)

	<u>Mengde pr flaske</u>	<u>Total volum</u>	<u>Medium</u>
Voksne	10-15 ml	40-60 ml	Aerob + anaerob+ sopp flaske Alt. 2 aerobe + 1 anaerob
Nyfødt(under 2 kg)	1-2 ml	2-4 ml	Ped flaske + soppflaske Alt. 2 Ped flasker (?)
Barn 2-12 kg	3 ml	6 ml	Ped flaske + soppflaske Alt. 2 Ped flasker (?)
Barn 12-36 kg	10 ml	20 ml	Ped flaske + soppflaske Alt. 2 Ped flasker (?)

(ESCMID Guideline 2012)

”Tid til deteksjon (TTD) ved Bactec 9240 var i større grad **avhengig av inoculum størrelse, Candida sp. og medium enn BacT/Alert**”

(George 2005)

Påstand : ” jo mer blod jo bedre”, da dette øker sannsynligheten for påvisning av agens

5. Positiv blodkultur- rutine for videre arbeid

- Direkte mikroskopi med Acridin og/eller Gram farging,
- Tusjpreparat ved mistanke om kryptokokker
- Calcofluor white (CFW)- ved mistanke om gjærsopp-infeksjon
- Kimrør test - (?)
- PNA FISH – 4 trinns metode for rask identifikasjon direkte fra blodkulturbuljong.
- MALDI TOF: Raskt og billig - Direkte fra blodkultur (ikke akkreditert enda)
- Utsæd

Medium	Inkubasjons-temperatur	Inkubasjons-tid	Bemerkning
Blod agar	37 ⁰ C	3 dager	1
Sjokolade agar	37 ⁰ C	3 dager	1
Lactose agar	37 ⁰ C	3 dager	1
Sabouraud agar	37 ⁰ C	3 dager	1
Chrome agar	37 ⁰ C	(2-)3 dager	1
Sabouraud agar m/ cycloheximide og olivenolje ² CHROMagar Malazzesia ²	30 ⁰ C v/kryptokokk-mistanke 30-35 ⁰ C	5-7 dager	3

¹ Forlenges ved mistanke om dimorf sopp/ annet

² Arendrup 2009

³ Mistanke om Malazzesia sp.infeksjon hos nyfødt/ premature

6. Positiv blodkultur – nåværende brukte metoder for rask identifikasjon

ALLE positive blodkulturisolater med sopp **skal** identifiseres til species nivå.

- **Chrome agar**- Candida sp. differensiering
- **MALDI TOF**: Massespektrometri er tatt i bruk ved flere laboratorier i Norge.(8?)
- **PNA FISH** – 4 trinns metode identifikasjon direkte fra blodkulturbuljong.
- **API** (Candida, 20C, 32C)
- **VITEK**
- **MicroScan** (Siemens Healthcare)-(microtiterplate, automatisert avlesning)
- **PCR og sekvensering**

Påstand :

”Alle laboratorier må kunne identifisere de vanligst forekommende Candida species (C.albicans 70 %, C. glabrata 15 %, og C. parapsilosis 5 %) i positive blodkulturer”

Det er avgjørende da de ulike gjærsopp species har et relativt forutsigbart resistensmønster, og dermed kan pasientene tidlig få adekvat behandling.

7. Positiv blodkultur – fremtidige nyttige metoder for rask identifikasjon

Molekylære metoder

8. Positiv blodkultur – resistensbestemmelse

ALLE positive blodkulturer med sopp **skal** resistensbestemmes.

- De vanligst benyttede metoder for resistensbestemmelse i Norge i dag er **E-test** (BioMeriuex) og **VITEK**.

9. Soppdiagnostikk – innsendelse til Referanse Laboratoriet

- Referanse Laboratoriet har en nasjonal stammebank av soppisolater
- innsamling av isolater har pågått siden 1991
- viktig i forhold til overvåking av nasjonal epidemiologi og resistensforhold.

Alle positive blodkulturer med gjærsopp og dimorfe sopp SKAL sendes inn.

- også fra **annet sterilt materiale enn** blod, satt på blodkultur flasker
- for repetert identifikasjon og resistensbestemmelse av isolatet

Referanser:

Arendrup MC, Fisher BT, Zaoutis TE. Invasive fungal infections in the paediatric and neonatal population: diagnostics and management issues. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:613–624.

Arendrup, M. C., Sulim, S., Holm, A., Nielsen, L., Nielsen, S. D., Knudsen, J. D., et al. Diagnostic Issues, Clinical Characteristics, and Outcomes for Patients with Fungemia. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3300–3308.

Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, Fuursted K, Johansen HK, Kjaeldgaard P, Knudsen JD, Kristensen L, Moller J, Nielsen L, Rosenvinge FS, Roder B, Schonheyder HC, Thomsen MK, Truberg K. 2011. National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *J. Clin. Microbiol.* 49:325–334.

Arendrup MC, Bergman OJ, Larsson L et al. Direct comparison of the BACTEC 9240 and the BacTAlert 3D automated blood culture systems. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:9-18.

Chiarini A, Palmeri A, Amato T, Immordino R, Distefano S, Giam-manco A. 2008. Detection of bacterial and yeast species with the Bactec 9120 automated system with routine use of aerobic, anaerobic, and fungal media. *J. Clin Microbiol*;46:4029 – 4033.

Cuenca-Estrella M et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012. Diagnostic procedures. *Clinical Microbiology and Infection* 2012;18 (Suppl. 7), 9–18

Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect Dis* 2003; 3:230–40.

Ericson, E-L., Klingspor, L., Ullberg, M., & Özenci, V. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. *Diag Microbiol Infect Dis* 2012;73:153–156.

George BJ, Horvath LL, Hospenthal DR. Effect of inoculum size on detection of Candida growth by the BACTEC 9240 automated blood culture system using aerobic and anaerobic media. *J Clin Microbiol* 2005;43:433–5.

Horvath LL, George BJ, Murray CK et al. Direct comparison of the BACTEC 9240 and the BacTAlert 3D automated blood culture systems for Candida growth detection. 2004. *Am Soc Microbiol*;42:115-18.

Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK et al. Detection of simulated candidemia by the BACTEC 9240 system with the plus aerobic/F and the anaerobic/F bloodculture bottles. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4714-17.6.

Jekarl DW, Lee SY, Lee S et al. Comparison of the Bactec Fx Plus, Mycosis IC/F, Mycosis/F Lytic blood culture media and the BacT/Alert 3D FA media for detection of Candida species in seeded blood culture specimens containing therapeutic peak levels of fluconazole. *J Clin Lab Anal* 2012; 26: 412-419.

Klingspor L, Muhammed SA, Ozenci V. 2012. Comparison of the two blood culture systems, Bactec 9240 and BacT/Alert 3D, in the detection of Candida spp. and bacteria with polymicrobial sepsis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31:2983–2987.

Meyer MH, Letscher-Bru V, Jaulhac B, Waller J, Candolfi E. Comparison of Mycosis IC/F and plus Aerobic/F media for diagnosis of fungemia by the Bactec 9240 system. *J Clin Microbiol* 2004;42:773–7.

Vetter E, Torgerson C, Feuker A et al. Comparison of BACTEC MYCO/F Lytic Bottle to the isolator tube, BACTEC Plus aerobic F/Bottle and BACTEC Anaerobic Lytic/10 Bottle and comparison of the BACTEC Plus Aerobic F/Bottle to the isolator tube for recovery of bacteria, mycobacteria and fungi from blood. 2001;39:4380-86.

UK standards of Microbiology investigations, Investigation of Blood Cultures (for Organisms other than Mycobacterium species)

https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/372070/B_37i8.pdf

2.3 Prøvetaking og forsendelse til mykologiske analyser

Nicola Isabelle Kols og Kjersti Wik Larssen, Avdeling for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs Hospital HF

Ved en mistenkt infeksjon forårsaket av sopp, er adekvat isolering og identifisering av den aktuelle sopparten viktig. For et laboratorium som tilbyr mykologiske analyser er riktig prøvetaking og forsendelse første trinn i påvisning av en soppart, og et laboratorium bør ha en veiledende funksjon i å formidle hvordan representativt prøvemateriale skal tas og hvilke prøvebeholdere som gir optimale forhold for ulike sopparter.

Noen lokalisasjoner krever spesielle prøvetakingsmåter, og det er viktig å sikre seg stort nok volum av det aktuelle materialet samt oppbevaring i riktig temperatur under forsendelse.

I blant ankommer prøvematerialer laboratoriet på en måte som ikke kan aksepteres. Dette kan skyldes administrative grunner (pasientens personnummer stemmer ikke med rekvisisjon eller prøve, ikke angitt hva prøvematerialet er) eller mangelfull prøvetaking (uegnede transportmedier, for lite prøvemateriale). Rekvirenten bør da kontaktes for å be om nytt prøvemateriale til riktig prosessering av prøven.

Nedenfor beskrives et utvalg av de vanligste prøvematerialene og hvordan prøvetaking og forsendelse bør foregå.

Blod og benmarg

Diagnostikk av soppinfeksjon med hematogen spredning er en viktig funksjon for laboratoriene. *Candida* spp. har tendens å vokse i standard blodkulturmedier, mens filamentøse sopp ofte krever spesielle buljongmedier eller isolatorrør. Før prøvetaking må huden desinfiseres med 70 % etanol eller klorheksidinsprit.¹

Prøven taes ideelt før oppstart av antimykotisk terapi, men ellers har tidspunkt ved prøvetaking ikke stor påvirkning på diagnostikken. Prøvevolum er derimot av kritisk betydning. For inokulasjon av et sett blodkulturer bør man sikre minst 20.0 ml blod fra voksne. Hos barn bør man forsøke å få mest mulig blod, men volumet må ofte tilpasses barnets alder og vekt.³ Både for voksne og barn er det anbefalt å ta 2-4 sett blodkulturer. En kan vurdere å sende 2 aerobe flasker i stedet for en aerob og en anaerob flaske da gjærsopp er strikt aerobe, eventuelt en aerob flaske pluss en mykosis flaske eller ett isolatorrør.³ Blodkulturer bør sendes innen 2 timer til laboratoriet ved romtemperatur for tidlig inkubasjon.¹

Når det er mistenkt infeksjon av muggsopp eller dimorfe sopp anbefales inokulasjon av 10.0 ml blod i hvert isolatorrør. Etter prøvetaking bør rørene transporteres direkte til laboratoriet under romtemperatur og helst behandles innen 8 timer etter inokulasjon³, men opptil 16 timer kan aksepteres¹. Ulemper med isolatorrør er en høy kontaminasjonsrate og like lang tid til påvisning av gjærsopp som automatiserte blodkulturer. Derfor er det ikke anbefalt å bruke isolatorrør som standardmetode ved mistenkt hematogen soppinfeksjon.¹

Ved mistanke på disseminert candidiasis, kryptokokkose, *Penicillium marneffe* eller histoplasmose er benmarg et anbefalt prøvemateriale. I tillegg bør analysering av disseminert soppinfeksjon suppleres med prøver fra andre aktuelle organsystemer som luftveiene og huden, samt at blodkulturer bør taes.^{2,5} Med unntak av histoplasmose, er disseminert soppinfeksjon hos immunkompetente personer en sjelden tilstand. Benmarg bør tas aseptisk i heparinrør eller pediatrik isolatorrør. Levret benmarg er ikke akseptabelt, heller ikke benmarg inokulert i blodkulturer grunnet CO₂-dannelse fra leukocytene. Optimalt prøvevolum er 0.5 ml fra barn og 3.0 ml fra voksne. Etter prøvetaking bør benmarg helst ankommes laboratoriet innen 15 minutter i romtemperatur og aldri nedkjølt.

Luftveisprøver

De vanligste materialene fra luftveier er munn-, nese- eller nasopharynxsekret, sputum/ekspektorat og bronkials skyllevæske. Prøvepinne over mucosa-overflate med mistenkt soppinfeksjon kan benyttes. Forsøk å unngå tungen. Prøvepinnen forsendes helst innen 2 timer ved romtemperatur. De fleste sopparter kan dyrkes fra standard bakteriologiske transportmedier.⁵ Ved mistenkt bihuleinfeksjon anbefales aspirat eller vev fra kirurgisk inngrep. Dyrkning av neseprøver kan ikke benyttes til diagnostikk av sinusinfeksjon.⁴ Lesjoner/sår i nese eller munnhule krever biopsitaking eller avskrap fra sårkanten.⁵ Morgensputum/ekspektorat etter tannbørsting er anbefalt for å senke bakteriell kontaminasjon. Ekspektorat eller morgensputum kan samles opp i vanlig prøverør. Bronkials skyllevæske bør oppsamles under kirurgiske/skopiske forhold i vanlig prøverør. Et større mengde bronkials skyllevæske øker sensitiviteten på soppdyrkning. Prøver fra nedre luftveier kan oppbevares i romtemperatur i opptil 2 timer etter prøvetaking. Utover dette er det anbefalt å oppbevare prøvene nedkjølt ved 4 °C for å hindre multiplisering av kommensale bakterier.^{1,4} På grunn av dette er 24-timers prøver fra nedre luftveier, spesielt sputum/ekspektorat, uegnede prøvematerialer til soppdyrkning og bør derfor ikke aksepteres.

Sterile kroppsvæsker (ikke blod)

Sterile kroppsvæsker blir sjeldent dyrkningspositive for sopp, men både ascites, spinalvæske, pleura-, synovial- og thoracentesevæske kan sendes inn til soppdyrkning.¹ Huden bør desinfiseres før prøvetaking. Anbefalt prøvevolum for ascites er 5-10 mL. For analyse av spinalvæske bør det mottas minst 3-5 mL, og hvis spinalvæske blir samlet i flere rør, bør røret med klarest innhold sendes til mikrobiologisk analyse. Et representativt volum av andre typer sterile kroppsvæsker bør oppsamles i flere sterile prøveglass.^{3,4} Ikke alle referanser angir et optimalt prøvevolum. Et prøvevolum på minst 2 mL bør sikres for optimal soppanalysering, men et større volum øker sensitiviteten på dyrkningen. Med unntak av spinalvæske, anbefales det å transportere de fleste sterile væsker i heparinrør eller isolatorrør for å unngå blodlevring. En annen måte å utføre soppdyrkning på er å inokulere blodkulturflasker direkte ved prøvetaking.¹ Spinalvæske derimot bør oppsamles i sterile rør med skrutopp. For alle sterile kroppsvæsker er det viktig å ha rask forsendelse til laboratoriet. Anbefalt transporttid er helst innen 15 minutter ved romtemperatur¹, men ankomst opptil 2 timer etter prøvetaking kan aksepteres³.

Urin, vaginalsekret og prostatasekret

Det bør taes midtstrømsprøve, suprapubisk eller kateterisert morgenurin. 24-timersurin kan ikke aksepteres til soppdyrkning. Vasking av huden før prøvetaking er fortsatt anbefalt for å minke et høyt antall bakterier som er forenelig med forurensning.³ For beste dyrkningsresultater må det samles opp et prøvevolum på 10-50 ml i steril beholder eller vakuumsrør med borsyre, og deretter sentrifugering for påvisning av dype mykoser.^{1,2,4} Urinprøven må sendes i romtemperatur til laboratoriet innen 1-2 timer, hvis dette ikke er mulig, bør urinprøven sendes nedkjølt i temperatur ved 4 °C.

Vaginalsekret kan tas med prøvepinne eller avskrap ved mistanke på residiverende soppinfeksjon.¹ Sekretet sendes i romtemperatur til laboratoriet med en transporttid som varierer per referanse fra 2 timer til 12 timer for prøvepinner i adekvat transportmedium.^{1,3} Pasienter med blastomykose eller kryptokokkose kan ha infeksjon i prostata.² For optimal prøvetaking bør pasienten tømme urinblæra før det blir utført prostatamassasje for å få utskilt prostatasekret. Prostatasekret bør inokuleres direkte på soppmedium eller transporteres til laboratoriet i steril beholder. Prøven bør ankommes laboratoriet innen 15 minutter og

oppbevares i romtemperatur.^{1,2} I tillegg kan første urinen etter prostatamassasje benyttes til soppdyrking. Den urinen er vanligvis utmerket for påvisning av endemiske mykoser.¹

Dermatologiske prøver

De vanligste prøvematerialene ved mistenkt overflate- eller kutan mykose er hudavskrap, hår og neglavskrap. Minst 10 hår med røtter bør samles, og en steril tannbørste kan i tillegg benyttes på infisert hodebunn i sirkulær bevegelse. Woods lampe kan brukes for å velge fluorescerende hår.^{1,4} Hudavskrap skal tas fra lesjonskanten og aldri fra sentrum, infiserte negler skal skrapes eller klippes av. Det er anbefalt å desinfisere hud for hudavskrap med 70 % alkohol før prøvetaking^{2,4}, men noen referanser mener at desinfeksjon i infisert område uansett prøvemateriale er best for å unngå bakteriell kontaminering^{1,3}. For overnevnte prøvematerialer er direkte inokulasjon på soppmedium ved å trykke materiale med steril prøvepinne og/eller tannbørste sakte ned i agaren en god praksis. Andre muligheter er å sende materialet i ren papirkonvolutt eller mellom 2 preparatglass. De fleste referanser anbefaler transporttid under 72 timer, men en enkel referanse angir en transporttid under 4 timer³. Det er viktig at prøvemateriale ikke skal forsendes under høy luftfuktighetsgrad i steril beholder for å hindre overvekst av bakterier.⁴ Transport på romtemperatur anses som optimalt. Dermatofytter er sensitive for kulde og nedkjølt prøvemateriale anbefales ikke.¹

Forskjellige prøvematerialer

Overnevnte prøvematerialer er blant de mest viktige og mest innsendte. I denne paragrafen skal det fokuseres på øyeprøver og vevsprøver. For andre prøvematerialer henvises til tabeller som finnes i referanselitteraturen.

Øyeseekret, korneaavskrap eller væske fra corpus vitreum er vanlige prøvematerialer ved mistanke om okulær soppinfeksjon. Ofte er det kun lite prøvemateriale tilgjengelig.

Øyeseekret kan tas med prøvepinne og bør transporteres på adekvat transportmedium i romtemperatur innen 15 minutter til 2 timer.^{1,3} Alternativt kan øyeseekretet inokuleres direkte på soppmedium etter prøvetaking.² Et preparat lages ved prøvetaking for farging med Calcofluor White.³ Soppinfeksjoner i kornea er assosiert med kontaktlinsebruk, traume eller okulære operasjoner. Korneaavskrap bør taes av øyelege og sås ut umiddelbart på ikke-inhibitorisk soppmedium (fe. Sabouraud dekstrose agar) med varmesterilisert platina spatel i to til tre C- eller X-formede figurer i sentrum av agaren, med avmerking på skåler hva som er første deponeringen. Et avskrap på preparatglass kan i tillegg sendes. Deretter bør det inokulerte mediet og preparatglass sendes raskt til laboratoriet til soppmikroskopi og inkubering. Væske fra corpus vitreum bør aspireres sterilt. Prøvemateriale bør sendes umiddelbart til laboratoriet i romtemperatur. Ofte er dette prøvemateriale fortynt med skyllevæske og sentrifugering er nødvendig for utsåing av bunnfallet.¹

Vevsprøver bør sendes i steril beholder med litt sterilt salt vann uten tilsetning for å unngå uttørkning.^{2,4} Anbefalt forsendelsestid varierer mellom 15 minutter og opptil 2 timer per referanse.^{1,3} Det er viktig å ta flere prøver. To til fire vev med størrelse med en ert per soppmedium er anbefalt.¹

Diskusjon & Konklusjon

Litteraturen viste stor konsensus i hvordan prøvetaking bør foregå, samt optimal forsendelse av de forskjellige prøvematerialene.

Direkte inokulasjon på soppmedier ved prøvetaking av dermatologiske og øyeprøver er en praksis de fleste referansene anbefaler. I praksis er dette ikke alltid gjennomførbart.

Klinikerne har ikke nødvendigvis god praksis i optimal utsåing og kontaminasjonsrate kan bli

høy. I tillegg kan det oppstå et logistisk problem med å ha lager med ferske soppmedier på en klinisk avdeling. På disse grunner bør direkte inokulasjon ved prøvetaking avtales mellom laboratoriet og avdelingen for å ha en avtale alle parter er fornøyd med. Transporttiden nevnt i litteraturen viste en stor variasjon fra 15 minutter opp til flere timer, men alle referanser var enige i at prøver bør sendes raskest mulig til et laboratorium for å optimalisere dyrkningsresultat.

Referanser:

1. J Versalovic, Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition, ASM Press
2. LS Garcia, Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd Edition, ASM Press
3. EJ Baron et al, A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM), CID 2013; 57 (4): e22-121
4. NL Wengenack et al, Principles and Procedures for Detection of Fungi in Clinical Specimens – Direct Examination and Culture; Approved Guideline, CLSI document M54
5. EJ Anaissie et al, Clinical Mycology, 2nd Edition, Churchill Livingstone Elsevier

2.4 Dyrkning inklusiv tabellarisk oversikt over prøve-materiale og dyrkningsbetingelser ved ulike kliniske problemstillinger (unntatt dermatofytter)

Karianne Wiger Gammelsrud, Avd. for Mikrobiologi, OUS HF, Rikshospitalet

Oppvekst av sopp fra kliniske prøver er avhengig av mange faktorer, særlig valg av medier, inkubasjonstemperatur og inkubasjonstid. I tillegg vil forutgående antimykotisk behandling kunne influere resultatet (dårligere/fraværende vekst).

Medier: Sabouraud agar (SAB) benyttes til både gjærsopp- og muggsoppdyrkning. For gjærsopp bør man legge til en kromskål når det er viktig å påvise blandingskultur (f.eks. immunosupprimerte og intensivpasienter). For muggsopp bør man vurdere å supplere med et rikere medium, f.eks. brain heart infusion (BHI) agar eller malt ekstrakt agar for spesielt «mugg-utsatte» pasienter (f.eks. transplanterte). Mugg vokser ofte raskere på disse mediene. Man kan også vurdere å sette flytende materialer på en aerob blodkulturflaske som inneholder anrikningsstoffer i tillegg til resiner som fjerner antibiotika.

Temperatur: De fleste *Candida*-arter (unntatt *C. famata*) og andre gjæresopparter vokser godt i 37°C. Det finnes imidlertid noen gjærsopplignende arter, f.eks. *Exophiala* spp, som trives best ved lavere temperaturer (28°C). Muggsopp vokser ofte godt i 37°C. Dimorf sopp bør inkuberes i både 37°C + 28°C som ledd i identifiseringen. Generelt kan man si at alle klinisk relevante sopp vokser godt i 28°C (unntatt Zygomycetes som trives best i 37°C), men bruker ofte mye lengre tid på å vokse, noe som kan være et problem i forhold til krav om rask diagnostikk.

Inkubasjonstid: Det finnes ingen fasit for optimal inkubasjonstid. De fleste *Candida*-arter vokser i løpet av 2 døgn, dog anbefales kromskålene å gå i 3 døgn. De fleste kryptokokker vokser frem på noen dager, men det kan også ta opptil 3-4 uker, særlig ved forutgående antimykotisk behandling. Den svenske strategirapporten fra 2010 gir en overordnet anbefaling om daglig avlesning i 1 uke for gjærsopp, forlenget inkubering til 2 uker ved

mistanke om muggsopp og opp til 4 uker ved mistanke om endemiske mykoser (kryptokokker og dimorf sopp). I sin artikkel, presenterer Bosshard en dyrkningsalgoritme med anbefaling om 5-7 dager for gjærsopp, 2 uker for muggsopp og inntil 4-6 uker for dimorf sopp og kryptokokker.

I litteraturen finner man mange forslag til utsædsskjema, men det finnes ingen internasjonal konsensus for utsæd og inkubering av prøver med tanke på sopp. Hovedutfordringene er bl.a. at det finnes utallige typer prøvematerialer. I tillegg må man vurdere pasientens klinikk eller underliggende diagnose. Eksempler på underliggende tilstander som kan gi økt risiko for soppinfeksjon er immunsuppresjon (særlig transplanterte, HIV og langvarig nøytropeni), intensivpasienter, premature, cystisk fibrose og diabetes. Nedenfor følger et forslag til utsæds-tabell som kan benyttes i diskusjonen på Strategimøtet for mykologi 2013.

Momenter til diskusjon:

- Medier: Hva bør være minimumskrav for valg av medier?
- Temperatur: Hvilke prøver bør gå i 28°C?
- Inkubasjonstid: Hvor lenge er lenge nok – og hva lar seg gjennomføre på et rutinelaboratorium?

Prøvemateriale	Medie(r)	Temperatur	Tid	Kommentar
Abscess	SAB + krom	37°C	3 d.	Vurdere blodkulturflaske
Aspirat/væske (sterile områder)	SAB	37°C	3-7 d.	Vurdere blodkulturflaske
Benmarg*	SAB	37°C + 28°C	7 d.	Vurdere blodkulturflaske
Biopsi/vev*	SAB	37°C + 28°C	7 d.	Vevet må ikke mortres
Utsæd av positiv blodkultur	SAB + krom	37°C	3 d.	
Hud	SAB	28°C		Se eget dermatofytt-innlegg
Kateterspiss	SAB	37°C	2-3 d.	CVK: semikvantitativ utsæd
Luftveier (immunfriske)	SAB + krom	37°C	2-3 d.	
Luftveier (immunsupprimerte)	SAB + krom	37°C + 28°C	7 d.	
Spinalvæske*	SAB	37°C	3 d.	
Sår	SAB	37°C	2-3 d.	Brannskade: 7 d.
Urin	SAB	37°C	2-3 d.	
Vaginalpensel	SAB + krom	37°C	2-3 d.	

Forkortelser: SAB (Sabouraud agar); CVK (sentralvenøst kateter); d (dager)

*Ved mistanke om kryptokokker og/eller dimorf sopp, eller ved positiv mikroskopi uten oppvekst, bør inkubering forlenges til 3-4 uker.

Referanser (anbefalt litteratur):

- Arendrup MC, Bille J, Dannaoui E, *et al.* ECIL-3 classical diagnostic procedures for the diagnosis of invasive fungal diseases in patients with leukaemia. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47:1030-45.
- Arendrup MC, Chryssanthou E, Gaustad P, *et al.* Diagnostics of fungal infections in the Nordic countries: we still need to improve! *Scand J Infect Dis.* 2007;39:337-43.
- Bosshard PP. Incubation of fungal cultures: how long is long enough? *Mycoses.* 2011;54:e539-45.
- Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC *et al.*; ESCMID Fungal Infection Study Group. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect.* 2012; Suppl 7:9-18.
- Walsh TJ, Gamaletsou MN, McGinnis MR, *et al.* Early clinical and laboratory diagnosis of invasive pulmonary, extrapulmonary, and disseminated mucormycosis (zygomycosis). *Clin Infect Dis.* 2012 Feb;54 Suppl 1:S55-60
- Vyzantiadis T-AA *et al.* From the patient to the clinical mycology laboratory: how can we optimise microscopy and culture methods for mould identification? *J Clin Pathol.* 2012;65:475-83.
- Svensk strategirapport mykologi:
<http://www.referensmetodik.smi.se/w/Referensmetodik:Svampinfektioner>
- UK Standards for Microbiology Investigations:
http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317136458974

2.5 Mikroskopi i diagnostikk av soppinfeksjoner

Kjersti Wik Larssen, Mikrobiologisk avdeling, St.Olavs Hospital HF

Hva er nytten av soppmikroskopi?:

Mikroskopi er en essensiell del av soppdiagnostikk, og har tre hovedfunksjoner:

- 1) Direkte påvisning av sopp i klinisk materiale.
- 2) Konfirmere at vekst av en sopp representerer infeksjon og ikke kontaminasjon
- 3) Identifikasjon av sopp basert på morfologisk utseende

Mikroskopi utføres billig og raskt, og kan gi en tidlig presumptiv diagnose ved soppinfeksjoner, - både overfladiske og systemiske, og være av betydning for tidlig igangsetting av korrekt behandling. Metoden forutsetter tilstrekkelig prøvemateriale. Dersom sparsomt prioriteres dyrkning (eller PCR), da dette er mer sensitivt. Unntak her er hud, hår og neglemateriale, der mikroskopi (eller PCR) bør foretrekkes fremfor dyrkning. Utseendet til soppen ved direkte mikroskopi kan være karakteristisk ved enkelte infeksjoner, og bidra til å optimalisere valg av initial behandling. Ulike fargeteknikker kan supplere hverandre.

Tilstedeværelse av soppelenter i preparatet er av verdi for å korrelere vekst i kultur mot klinisk betydning, særlig ved vekst av en sopp som kan være kontaminant, men som også kan gi infeksjon. Positiv dyrkning og negativ mikroskopi kan skyldes at: a) soppen koloniserer pasienten uten å gi infeksjon, b) soppen er en kontaminant i laboratoriet, c) prøven til mikroskopi og dyrkning er tatt fra to ulike områder, d) prøven er ikke mikroskopert grundig nok eller trenger spesielle fargeteknikker (histopatologi).

Sensitiviteten ved soppdyrkning er variabel, og mange sopper er vanskelige å dyrke i laboratoriet. For en del pasienter vil derfor diagnosen stilles kun ved hjelp av mikroskopi. En negativ soppmikroskopi utelukker aldri en soppinfeksjon.

Hvilke prøvematerialer skal mikroskoperes?:

Soppmikroskopi bør alltid gjøres ved mistanke om invasiv mykose. Prioriteres som hasteprobe på immunsupprimerte eller alvorlig syke pasienter. Aktuelle materialer kan være sputum, BAL, ekspektorat, abscessinnhold, vevsbiopsier/ aspirat, bihuleaspirat, sinus trakt exudat, corneaavskrap, blodutstryk, beinmarg, CSF og urin.

Hudavskrap, hår og neglemateriale er egnet for soppmikroskopi, og skal prioriteres dersom lite materiale grunnet dårlig sensitivitet ved dyrkning.

For vaginalprøver anbefales ikke rutinemessig mikroskopi av prøver tatt med pensel.

Sensitiviteten er ca 50 % i forhold til dyrkning.

CSF, urin og andre tyntflytende kroppsvæsker sentrifugeres ved 1500 rpi/min i 10 min.

Sedimentet brukes til dyrkning og mikroskopi.

Fargemetoder direkte mikroskopi:

* IF (Immunfluorescens).

Metode	Egenskap ved test	Kommentarer
10 % KOH	Løser opp celler/ debris/ vev og letter vanlig lysmikroskopi Ser pigment i soppfyfene	Krever erfaring. Falske positive/ falske negative resultat mulig. Mindre sensitiv enn KOH + optical brightener.
10 % KOH + optical brightener (Calcofluor White, Blankophor mm)	Farger chitin og cellulose i sopp-celleveggen, inklusive <i>Pneumocystis jirovecii</i> cyster. Fluorescerer skarpt grønt eller blåhvitt under UV lys. Økt sensitivitet, rask screening.	Krever IF-mikroskop. * Får ikke frem pigment. Artefakter kan gi fluorescens. Krever erfaring.
Fluorescein konjugerte monoklonale antistoffer	<i>Pneumocystis jirovecii</i> asci (cyster) fluorescerer eplegrønt. Cysteinhold farger som regel ikke.	Krever IF-mikroskop. * Mindre sensitiv enn PCR. Lettere for uerfarne enn Giemsa.
India Ink (tusj)	Rask presumtivt diagnostikk av <i>cryptococcus spp</i> i spinalvæske. Kan brukes også på urin/ andre kroppsvæsker	Falsk negative (for mye blekk) Lymfocytter kan ligne <i>cryptococcus spp</i> . Antigentest mest sensitive metode!
Gram	Kan gi indikasjon på sopp i en prøve. Aerobe actinomycetes Alltid som supplement til KOH+ optical brightener ved hjernebiopsier.	Både gjærsopp og muggsopp kan farge svært variabelt med Gram. Farger ikke alltid hyfer eller pseudohyfer. Mer spesifikk soppfargemetode kreves.
Acridin oransje	Vil farge både gjærsopp ogeventuelt muggsopp. Oransje/rød fluorescens som bakterier.	Viser ikke hyfestrukturer som septa eller hyfevegg. Mer spesifikk soppfargemetode kreves.
Giemsa	Farger sopp og bakterier blållilla. Farger også <i>Pneumocystis jirovecii</i> (alle stadier)	OBS! <i>Leishmania spp</i> med mer kan ligne soppelementer.

Fargemetodene som velges avhenger av utstyr tilgjengelig. 10 % KOH + optical brightener Blankophor er anbefalt metode for de fleste situasjoner og har høyere sensitivitet enn KOH alene (9,10). Preparatene screenes med 100x forstørrelse, og deretter 400x for vurdering av strukturer. Preparatet kan om nødvendig farges i etterkant med Gram, Grocott metenamin sølv (GMS) eller Periodic acid schiff (PAS).

Spinalvæsker farges i tillegg med India Ink.

Ved mistanke om pneumocystis: supplement med fluorescein konjugerte monoklonale antistoffer (evt Giemsa eller GMS).

Avhengig av mistenkt etiologi kan man supplere med 10 % KOH og vanlig lysmikroskopi for å vurdere farge på observerte hyfer.

Ved mistanke om endemiske mykoser, suppler med Giemsa og histopatologiske fargemetoder (GMS, PAS) på beinmarg, blodutstryk, CSF, BAL eller annet materiale.

Oppskrift på fargemetoder finnes i diverse av lærebøkene under referanser.

Ved direkte mikroskopi, se etter:

Gjærceller:

- Størrelse: små (2-5 µm), moderate (6-15 µm) eller store (>15 µm)
- Knoppskyting (uni-, bi- eller multipolar? Smal eller bredbasert?)
- Pseudomycel +/-?
- Kapsel +/- (India ink)

Sopphyfer:

- Ekte hyfer eller pseudohyfer? (parallele vegger, rette septa uten innsnevring)
- Forgreining (90 grader eller 45 grader)
- Septa +/- (OBS også mucormycotina kan ha enkelte septa).
- Bredde, vegttykkelse, regularitet
- Pigment +/- (KOH preparat ved mistanke om phaeohyphomycosis)

Fargemetoder histopatologi:

Fargemetode	Egenskap	Kommentar
Hematoxylin og Eosin (H&E)	Farger noen soppelementer lilla. Tillater naturlige pigment i soppen. Nødvendig for å se vertens vevsreaksjon.	Lite kontrast til bakgrunn, noen sopp synes dårlig. Farger ikke celleveggen, kun cytoplasma og kjerne.
Grocott/Gomori Metenamin Sølv (GMS)	Farger cellevegg Sopp i vev inklusive pneumocystis og nocardia/ actinomycetes blir grå/sorte.	Farger soppen for kraftig til å se strukturelle detaljer. <i>Mucorales</i> kan i noen tilfeller farges dårlig. Tidkrevende.
Periodic Acid Schiff (PAS)	Farger sopp rosarød. (Påviser glykogen)	Enkelte PAS positive artefakter kan likne på gjærceller.

Ved de fleste invasive mykoser anbefales samtidig prøve til histopatologi. Alltid ved vev/ biopsier. Da vil det også være mulig å vurdere vevsreaksjonen (akutt/ kronisk inflammasjon, granulomatøs betennelse, angioinvasjon, infarkt/nekroser) rundt eventuelle soppelementer. Patologene må informeres om mulig soppdagnose. En kombinasjon av ulike fargeteknikker er ofte nødvendig, da rutinemetoden ikke alltid farger alle sopper. Andre mulige fargemetoder som kan være nyttige i spesielle situasjoner er Mucicarmine (cryptokokk kapsel) farging, Fontana Masson farging (påviser melanin i sopp) eller modifisert syrefastfarging (aktinomykose). Soppelementene kan være ujevnt fordelt i materialet. Flere undersøkelser/ biopsier kan være nødvendig.

Mikroskopisk vurdering av vekst/ artsidentifikasjon av sopp:

Fargemetode	Egenskap	Kommentar
Lactophenol cotton blue (LPCB)	Lactic acid bevarer soppstrukturen, phenol dreper soppen, anilin blå farger ytre cellevegg og glyserol hindrer uttørring.	Lactic acid cotton blue kan vurderes som alternativ for sopp uten smittepotensiale/ kontaminasjonspotensiale.

Legg opp preparat med inokulasjonsnåler (tease) eller tape på objektglass med LPCB. Få oversikt med 10x linse. Se på strukturer med 40x linse. For detaljer brukes 100x linse/ oljeimmersjon. Let etter hyfer og konidier/ sporer. Dersom dette mangler, vurder subkultur på medier som fremmer sporeproduksjon (for eksempel Potet dextrose agar, Cornmeal agar) samt forlenget inkubasjon. Slide culture kan i noen situasjoner være nødvendig for å få god oversikt over strukturer, men må aldri benyttes ved mistanke om endemisk mykose eller annen sopp tilhørende smitterisikogruppe 3 på grunn av smittefare. Som regel vil en ved bruk av LPCB kunne vurdere naturlig pigment i hyfer og konidier. Bruk atlas/ oppslagsverk i artsidentifikasjonen, for eksempel referanse 2 og 4.

Rapportering av direkte mikroskopisvar:

Vurdering av mikroskopifunn må sees i lys av prøvematerialet og kliniske opplysninger. Ethvert direkte mikroskopifunn av soppelenter i sterilt materiale som blod, CSF, dialysevæske, dype biopsier, peritonealvæske, ascitesvæske med mer skal straks rapporteres til kliniker som sikkert tegn på en soppinfeksjon. Fortrinnsvis telefonsvar til behandlende lege.

Soppelenter påvist i hud og neglemateriale rapporteres også samme dag til kliniker, og kan tolkes som sikkert tegn på soppinfeksjon, uavhengig av utfall av dyrkning.

Funn av hyfer forenlig med muggsopp i for eksempel BAL eller prøver fra bihuler må vurderes i lys av sykehistorien. Histopatologi vil kunne avklare eventuell angioinvasjon. På generell basis vil faren for invasiv mykose (aspergillose, fusariose, mucormykose med mer) være større jo lenger og mer alvorlig en immunsvekkelse er. Særlig er nøytropene, transplanterte og de med høydose steroidbehandling utsatte. Vær også OBS ved opplysninger om diabetes, brannskade og nyresvikt, særlig i forhold til mucormykose. Diskusjon med kliniker er nyttig, og svaret bør rapporteres telefonisk til behandlende lege straks.

Cryptococcosis og endemiske mykoser sees særlig ved HIV, men også ved andre tilstander med immunosuppresjon. Vær oppmerksom på mulighet for endemiske mykoser, også hos personer det er lenge siden har opphold seg i endemisk område dersom nytilkommet immunsvekkelse. Dyrkning skal i så fall foregå i et P3 laboratorium. Det kliniske materialet i seg selv representerer ikke noen smittefare. Se eget innlegg om endemiske mykoser. Telefonisk beskjed til behandlende lege samme dag ved suspekerte funn i direkte mikroskopi.

Positiv soppmikroskopi besvares skriftlig kun når man er sikker på at funnet er reelt og ikke et artefakt. Bruk ulike fargemetoder dersom tvil. Be eventuelt om mer materiale hvis behov for nærmere undersøkelser.

Følgende kommentarer er forslag som kan benyttes ved skriftlige svar av soppmikroskopi inntil svar på dyrkning eller andre undersøkelser (antigentest, PCR analyse) følger:

- Soppelenter ikke påvist
- Soppelenter påvist, eventuelt nærmere spesifisert:
 - Gjærceller påvist
 - Gjærceller med pseudomycel påvist
 - Gjærceller med kapsel påvist
 - Sopphyfer påvist
 - Sopphyfer med septa påvist (kun når sikker)
 - Pigmenterte sopphyfer påvist
 - Brede båndliknende sopphyfer uten septa påvist (kun når sikker)
 - Soppelenter forenlig med *Malassezia species* påvist
 - For hår: Artrokonidier påvist. Endothrix/ ectothrix hårinvasjon.

Referanser:

1. CLSI M54-A. Vol32 No14. 2012: Principles and procedures for detection of fungi in clinical specimens- direct examination and culture; approved guideline.
2. Larone DH. Medically Important Fungi. A guide to identification, 5th ed, ASM Press, Washington, DC, 2011.
3. Guarner J, Brandt ME. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. Clin Microb Rev 2011; 24: 247-280.
4. De Hoog GS, Guarro J, Figueras G & MJ. Atlas of clinical fungi. 3d edition.
5. Reiss E, Shadomy HJ, Lyon GM. Fundamental medical mycology. Wiley –Blackwell publishing 2012. (ISBN 978-0-470-17791-4)
6. Manual of Clinical Microbiology, Ed. Murray et al, Section VII Fungi. ASM Washington DC. 10th ed, 2011, vol 2, side 697-846
7. Garcia LS. Clinical Microbiology procedures handbook, 3d ed, vol2, ch 8. ASM press 2010.
8. Referensmetodik.smi.se. Referensmetodik: Svampinfeksjoner.
9. Lasseter G, Palmer M, Morgan J et al. Developing best practice for fungal specimen management: audit of UK microbiology laboratories. Brit J Biomed Science 2011; 68: 197-202.
10. Hamer EC, Moore CB, Denning DW. Comparison of two fluorescent whiteners, Calcofluor and Blankophor, for the detection of fungal elements in clinical specimens in the diagnostic laboratory. CMI 2006; 12: 181-184.
11. UK Standards for Microbiology Investigations. Investigation of dermatological specimens for superficial mycoses. Issued by the Standards Unit, Health Protection Agency. Bacteriology/B39/Issue no 2:1. 2012.
12. Procop GW, Haddad S, Quinn J et al. Detection of *Pneumocystis jiroveci* in respiratory specimens by four staining methods. J Clin Microbiol 2004; 42: 3333-3335.
13. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. 2d ed. Churchill Livingstone, Elsevier. 2009.
14. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the infectious diseases society (IDSA) and the American society for microbiology (ASM). CID 2013; 57:e22-121.

2.6 Serologiske tester og antigenpåvisning ved sopp- infeksjoner

Cecilie Torp Andersen, Mikrobiologisk avdeling, OUS Rikshospitalet

Innledning:

Gullstandardtester for påvisning av invasive soppinfeksjoner er lite sensitive og tar ofte lang tid. Pasientpopulasjonen ”at risk” øker og dødeligheten av disse infeksjonene er høy på tross av nye soppmidler og økende forbruk. Gjennom år er det jobbet med tester som raskere og bedre kan skille ut pasienter med aktuell soppinfeksjon ved hjelp av surrogatmarkører for påvisning av aktuelle agens.

På markedet er det noen få aktuelle hurtigtester (lateral flow- for påvisning av kryptokokk antigen og aspergillus antigen,) i tillegg til agglutinasjonstester for bla kryptokokk og candida antigen, i høyendemiske land tilbys også antigen testing av dimorfe sopparter. En serologisk test benytter ”Limulus amebocyte lysat” til påvisning av β -1,3-D-glukan, en celleveggskomponent i ulike sopparter, i tillegg finnes mer tradisjonelle serologiske tester for påvisning av ulike antigen som galaktomannan- (aspergillus antigen) og mannan (candida antigen) og tester for påvisning antistoff mot aspergillus, andre muggsopp og candida (mannan). Det benyttes fremdeles immundiffusjon eller dobbeldiffusjon for påvisning av presipiterende antistoff både mot Aspergillus og dimorf sopp. Valg av analytt og anbefalt metode for påvisning av de aktuelle agens avhenger av klinisk problemstilling og i stor grad insidensen til sykdommen som skal påvises. Mange av testene som omhandles i dette avsnittet

kan ikke sies å være optimale, men brukt fornuftig kan de bidra til tidligere diagnose, sikrere diagnostikk og forhåpentlig være indikasjon på fravær av aktuell sykdom.¹ Internasjonalt er det utarbeidet anbefalinger for nytten av flere av disse testene, mens det for nyere tester ikke er nok studier til å konkludere og disse utelates i denne oversikten.^{2,3}

Referanser:

- 1: Barnes A. Directed therapy for fungal infections: focus on aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:2431-2434.
- 2: Cuenca-Estrella M et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012. Diagnostic procedures. *Clinical Microbiology and Infection* 2012; 18 (Suppl. 7), 9–18
- 3: Maertens J, Marchetti O, Herbrecht R, Cornely OA, Flückiger U, Frère P, Gachot B, Heinz WJ, Lass-Flörl C, Ribaud P, Thiebaut A, Cordonnier C; Third European Conference on Infections in Leukemia. European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3-2009 update. *Bone Marrow Transplant*. 2011 May; 46(5):709-18.

2.6.1 Antigentester:

Kryptokokkantigen:

Kapselpolysakkaridet glucuronoxylomannan produseres av ulike *Cryptococcus* sp og kan påvises i ulike kroppsvæsker ved sykdom. Påvisning av kryptokokkantigen i serum ved disseminert sykdom og i spinalvæske ved kryptokokkmeningitt er en god markør for aktuell infeksjon.^{1,2} Det er viktig å merke seg at kryptokokkinfeksjon også forekommer hos immunkompetente (pneumoni og meningitt) og at disse pasientene kan ha normalt celletall og lite utslag på spinalsukker og protein. Positiv kryptokokkantigen med lavt titer i spinalvæske (eventuelt BAL) kan være eneste indikasjon på sykdom, da dyrkning kan være negativ. Tradisjonelt har lateksagglutinasjon vært benyttet, med høy sensitivitet i spinalvæske i alle pasientgrupper og i serum ved HIV/AIDS. Rikshospitalet utfører en screeningtest i serum og spinalvæske og om positiv test utføres titrering. Titer kan benyttes til å vurdere behandlingseffekt. Testen tilbys av flere firmaer. (Meridian Diagnostics, International Biological Labs, MicroScan, Eiken, Murex Biotech og IMMY.) Prøvene må forbehandles før agglutineringsutførelse. Sensitivitet og spesifisitet angis mellom hhv 93–100 % og 93–98 %. Kryptokokkantigen kan også påvises med Enzyme immunoassays med sensitivitet og spesifisitet mellom hhv 85–99 % og 97 %. Falskt positivt resultat (0–0,4 %) opptrer pga reumatoid faktor og infeksjon med *Trichosporon* sp. Det er nå utviklet en enkel og svært sensitiv hurtigtest (IMMY) som i høyendemiske områder til og med kan utføres i urinen hos pasienter med HIV/AIDS med spørsmål om kryptokokkinfeksjon (antatt 20 fold lavere titer i urin enn i spinalvæske). Hurtigtesten er en dip-stic test som bør være tilgjengelig for å diagnostisere kryptokokkmeningitt hos risikopasienter også i Norge. Testen krever ingen forbehandling og skal være minst like sensitiv og spesifikk som lateksagglutinasjon og bør på sykehus benyttes i serum, spinalvæske og BAL.³⁻⁵

Referanser:

- 1: Arendrup MC, Bille J, Dannaoui E, et al ECIL-3 classical diagnostic procedures for the diagnosis of invasive fungal diseases in patients with leukaemia Bone Marrow Transplantation (2012) 47, 1030–1045
- 2: Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect Dis* 2003; 3:230–40.
- 3: Lindsley M, Mekha N, Baggett H, et al. Evaluation of a newly developed lateral flow immunoassay for the diagnosis of cryptococcosis. *Clin Infect Dis*. 2011;53:321–5
- 4: Klausner JD, Vijayan T, Chiller T. Sensitivity and specificity of a new cryptococcal antigen lateral flow assay in serum and cerebrospinal fluid. *MLO Med Lab Obs*. 2013;45:16–20.

5: Gates-Hollingsworth MA, Kozel TR. Serotype sensitivity of a lateral flow immunoassay for cryptococcal antigen. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20:634–5.

2.6.2 Antigenpåvisning ved infeksjoner med dimorf sopp

Utføres ikke i Norge

Påvisning av *Aspergillus* antigen (*Aspergillus* hurtigtest):

Dette er en immunkromatografisk hurtigtest. Testen benytter et monoklonalt antistoff JF5 som bindes til ekstracellulært glykoprotein (α -1-3-, α 1-6-linked mannoprotein) som bare produseres av *Aspergillus* når hyfene vokser.¹ Den skal være i stand til å skille mellom tilstedeværelse av hyfer (invasiv infeksjon) og tilstedeværelse av sporer og kryss-reagerer ikke med antigen fra andre klinisk relevante sopp som ulike arter av *Candida*, *Trichosporon*, *Fusarium*, *Scedosporium* og *Zygomycetes*, men testen kryss-reagerer med *Penicillium* spp og *Paecilomyces variotti*. Foreløpig er det få studier, men testen synes lovende.² Den kan vurderes brukt bedside, evt i kombinasjon med andre tester.^{3,4}

Referanser:

1: Thornton CR. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1095-105.

2: Wiederhold NP, Najvar LK, Bocanegra R, Kirkpatrick WR, Patterson TF, Thornton CR. Interlaboratory and interstudy reproducibility of a novel lateral-flow device and the influence of antifungal therapy on the detection of invasive pulmonary aspergillosis. *J. Clin. Microbiol-* 2012;51:459–465.

3: Barnes A. Directed therapy for fungal infections: focus on aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:2431-2434.

4: Lindsley MD The future of Fungal Serology. *Curr Fungal Infect Rep* (2013)7:161-170

2.6.3 *Aspergillus* antigen - galaktomannan:

Galaktomannan produseres i hyfene og inkorporeres i glykoproteiner i celleveggen til ulike *Aspergillus* sp. Under gunstige vekstforhold især ved angioinvasiv sykdom kan galaktomannan påvises i serum og galaktomannan kan brukes som surrogatmarkør for invasiv aspergillusinfeksjon hos risikopasienter.¹⁻³ Mengden galaktomannan i serum korrelerer med graden av invasiv sykdom og tillegges betydning som indikasjon på invasiv soppinfeksjon iht EORTC/MSG definisjoner av invasiv aspergillusinfeksjon⁴.

I studier oppgis sensitivitet opp til 90 % og spesifisitet på 84 % ved serietesting av risikopasienter ved høy insidens av invasiv aspergillose, mens man må godta langt dårligere verdier i andre pasientpopulasjoner.

Galaktomannan kan undersøkes i serum²⁻⁴ og BAL.⁶⁻⁷ Cut off: OD-indeks 0,5. For bedret spesifisitet anbefales 2 positive prøver i serum. Testen er FDA godkjent og anbefales av ECIL3 og ESCMID for enkelte pasientkategorier. Falsk negativ resultat i serum forekommer hos ikke-nøytropene, transplanterte, pasienter med CGD, Jobs syndrom og ved lokalisert abscessdannelse. Galaktomannan i BAL kan indikere invasiv lungeaspergillose ved suspekt klinikk og har høyere sensitivitet enn i serum hos ikke nøytropene pasienter. Testen kan også utføres i spinalvæske og andre kroppsvæsker, men er ikke valdidert for dette. Testen påvirkes negativt av profylakse eller pågående behandling med muggaktive medikamenter.⁵ Falsk positive verdier har vært rapportert pga forurensning i betalaktamantibiotika, særlig knyttet til tazobactam, men dette synes nå mindre problematisk og unngås om prøven tas før antibiotika injiseres. Cycofosamid kan gi falsk positiv galaktomannan og det er rapportert om kryssreaksjon med enkelte *Bifidobacterium* arter, noe som gjør testen uegnet hos spedbarn.

Galaktomannan finnes i ulike matvarer (eks soya og morsmelkerstatning) noe som kan gi falsk positiv prøve ved bla. mukositt og GVHD.

Screening 2-3 ganger ukentlig anbefales i enkelte høyrisikogrupper ved langvarig aplasi og eventuelt ved GVHD, men bør ikke utføres som ”villscreening”. Positivt resultat må alltid verifiseres med ny prøve, og må lede til utvidet diagnostikk med CT/MR og ved fokale funn anbefales BAL, eventuelt biopsi for å verifisere agens om dette lar seg gjøre.⁵ Uten slik utredning innen rimelig tid anbefales fortsatt empirisk strategi for behandling, men satt i system bør screening kunne bidra til en mer diagnosebasert behandling, tidligere og av riktigere pasienter.

Galaktomannan kan også benyttes som surrogatmarkør for påvisning av mulig agens ved *utredning* hos immunosupprimerte ved mistanke om infeksjon, men må alltid sees i sammenheng med klinikk, radiologiske funn og andre undersøkelser som histologi, dyrkning og mikroskopi og ved denne problemstilling anbefales *både* serum og BAL evt. spinalvæske. Negativ undersøkelse i serum i denne pasientgruppen utelukker ikke infeksjon, men i BAL støtter positiv indeks muligheten for aktuell aspergillusinfeksjon og negativ prediktiv verdi i BAL ved samtidige lungeinfiltrat er god.⁶⁻⁸ Produsenten angir cutoff OD-indeks >0,5 også i BAL, men flere studier antyder at spesifisiteten øker om cutoff økes til 1,5 og anser verdier >3.0 som svært suspekt på aktuell aspergillusinfeksjon⁷. Fall i galaktomannan under pågående behandling kan være indikasjon på behandlingseffekt, mens videre stigning eller vedvarende høy verdi kan tyde på det motsatte.⁵

Galaktomannan er også positiv i serum ved infeksjon med bla *Penicillium marneffeii*, *Histoplasma capsulatum*, i BAL kan galaktomannan kryss reagere med kontaminanter som andre *Penicillium species* og *Paecilomyces species*.

Referanser:

- 1: Maertens J, Verhaegen J, Demuyneck H, Brock P, Verhoef G, Vandenberghe P, Van Eldere J, Verbist L, Boogaerts M. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive Aspergillosis. J Clin Microbiol 1999;37:3223-3228.
- 2: Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, Verschakelen J, Lagrou K, Verbeken E, Wilmer A, Verhaegen J, Boogaerts M, Van Eldere J. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. Clin Infect Dis 2005;41:1242-1250.
- 3: Maertens J, Van EJ, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. J Infect Dis 2002;186:1297-1306.
- 4: De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Muñoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE (2008) Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Disease Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis 46:1813–1821
- 5: Cuenca-Estrella M, et al. 2011. Detection and investigation of invasive mould disease. J. Antimicrob. Chemother. 66(Suppl 1):i15–i24.
- 6: Agrawal S, Hope W, Sincó J et al. Optimizing management of invasive mould diseases J. Antimicrob. Chemother. 2011;66:i45-i53
- 7: Maertens J, Maertens V, Theunissen K, et al. Bronchoalveolar lavage fluid galactomannan for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases. Clin Infect Dis 2009;49:1688-93.
- 7: D'Haeseleer J, Theunissen K, Vermeulen E et al Detection of Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples of Patients at Risk for Invasive Pulmonary Aspergillosis: Analytical and Clinical Validity J. Clin. Microbiol. (2012) 50 (4): 1258-1263

- 8: Nguyen MH, et al. 2011. Galactomannan testing in bronchoalveolar lavage fluid facilitates the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies and stem cell transplant recipients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 17:1043–1050.
- 9: Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S, Spriet I, Verbeken E, Van Wijngaerden E. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:27-34.
10. Bergeron A, Belle A, Sulahian A, Lacroix C, Chevret S, Raffoux E, Arnulf B, Socié G, Ribaud P, Tazi A. Contribution of galactomannan antigen detection in bronchoalveolar lavage to the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies. *Chest* 2010;137:410-415.
11. Penack O, Rempf P, Graf B, Thiel E, Blau IW. False-positive Aspergillus antigen testing due to application of piperacillin/tazobactam--is it still an issue? *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60:117-120.

2.6.4 β - 1,3-D-glukan (utføres ikke i Norge)

β -1,3-D-glukan er en polysakkaridkomponent i celleveggen til ulike soppespecies med et viktig unntak for kryptokokker og Zygomycetes. Testen anses derfor mer "panfungal" enn galaktomannan og er også beskrevet positiv hos pasienter med pneumocystisinfeksjon. Påvisning av β -1,3-D-glukan er tillagt vekt som indikasjon på invasiv soppinfeksjon iht. EORTC/MSG definisjoner på linje med galaktomannan¹ og anbefales av ESCMID som surrogatmarkør ved invasiv soppinfeksjon ved ulike problemstillinger². β -1,3-D-glukan kan påvises i serum og plasma. Screening av høyrisikopasienter anbefales minst 2 ganger ukentlig i tillegg påvisning som ledd i utredningen av akutt invasiv mykose hos immunsupprimerte og risikopasienter på indikasjon.³ Testen synes nyttig på intensivenheter på pasienter med høy risiko for invasiv soppinfeksjon, men sensitivitet og spesifisitet er varierende avhengig av risikogruppe og har stor variasjon i ulike studier.⁵ Også påvisning av β -1,3-D-glukan er beheftet med falsk positive resultat, bla i forbindelse med kontaminasjon med betaglucan fra visse celluloseholdige membraner brukt ved hemodialyse og ved bruk av glukaneholdig forbindningsmaterieell i forbindelse med kirurgiske prosedyrer. Dessuten er det påvist falsk positive verdier hos pasienter som har fått bla albumin, immunglobulinprodukter og enkelte betalaktamantibiotika. Testen tilbys fortsatt ikke i Norge, men i pasientgrupper med høy risiko for soppinfeksjoner kan testen vurderes innført sammen med galaktomannan. Man kan da tenke at negativ prediktiv verdi av testene i parallell vil kunne demme opp for empirisk bruk av antifungale midler^{4,5}, og dessuten vil vi forhåpentligvis få et tilleggskriterium for evaluering av positiv *Pneumocystis jirovecii* PCR hos pasienter med negativ mikroskopi.⁶⁻⁸ Det finnes flere kommersielle tester: Wako, Glucatell, Fungitec-G og Fungitell, sistnevnte er mest benyttet i Europa. Til forskjell fra galaktomannan påvirkes testen lite av antifungale midler og β -1,3-D-glukan gjenfinnes i serum i lang tid på tross av adekvat behandling.

Referanser:

- 1: De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Muñoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE (2008) Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Disease Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 46:1813–1821
- 2: Cuenca-Estrella M et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012. Diagnostic procedures. *Clinical Microbiology and Infection* 2012;18 (Suppl. 7), 9–18
- 3: Acosta J, Catalan M, Del Palacio-Perez-Medel A, Montejo JC, De-La-Cruz-Bertolo J, Moragues MD, Ponton J, Finkelman MA, Del Palacio A. (2011) Prospective study in critically ill non-neutropenic patients: diagnostic potential of (1,3)-b-D-glucan assay and circulating galactomannan for the diagnosis of invasive fungal disease. *Eur J. Clin. Microbiol Infect Dis.* 2011 Aug 3.

- 4: Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, Marchetti O. β -Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin. Infect. Dis.* (2012) 54:633–643.
- 5: Theela, ES, Doernb CD. β -d-Glucan Testing Is Important for Diagnosis of Invasive Fungal Infections *J. Clin. Microbiol.* (2013) 51 (11): 3478-3483
- 6: Del Bono, V., Mularoni, A., Furfaro, E., Delfino, E., Rosasco, L., Miletich, F., and Viscoli, C. (2009) clinical evaluation of (1-3)- β -D-Glucan assay in presumptive *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients. *Clin. Vacc. Immunol.* 16: 1524-1526
- 7: Del Palacio, A., Llenas-Garcia, J., Soledad Cuetara, M., Pulido, F., Rubio, R., Ponton, J., Del Palacio-Perez-Medel, A. (2010) Serum (1-3)- β -D-Glucan as a noninvasive adjunct marker for the diagnosis and follow-up of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with HIV infection. *Clin. Infect. Dis.* 50: 451-2.
- 8: Desmet, S., Van Wijngaerden, E., Maertens, J., Verhaegen, J., Verbeken, E., De Munter, P., Meersseman, W., Van Meensel, B., Van Eldere, J., Lagrou, K., (2009) Serum (1-3)- β -Dglucan as a tool for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection or hematological malignancy. *J. Clin. Micro.* 47: 3871-4

2.6.5 Kombinert antigen og antistoffpåvisning:

Candida mannan og anti- mannan antistoff (utføres ikke i Norge)

Mannan er polysakkarid i celleveggen til ulike *Candida* species og kan benyttes som en surrogatmarkør for candidainfeksjon.¹ Påvisning av kombinert antigen/antistoff i blod anses som en relativt sensitiv markør for candidemi og kronisk dissiminert sykdom.^{1,2} Men sensitiviteten er avhengig av speciesdistribusjon og angis å være opp mot 100 % for *C.albicans*, noe dårligere ved *C.glabrata* (83 %) og *C.tropicalis* (80 %), men dårlig ved *C.parapsilosis*, *C.krusei* og *C.kefyr* (40-50%). Totalt oppgis en sensitivitet på 80 % og en spesifisitet på 90 % ved gjentatt prøvetaking, men også her er det store variasjoner i ulike studier avhengig av pasientpopulasjonene som testes. Negativ prediktiv verdi angis å være > 85 %. Testene synes ikke like egnet hos risikopasienter på profylakse. Brukt fornuftig hevdes det at infeksjon kan detekteres tidligere, opp til 16 dager før positiv kultur ved kronisk dissiminert sykdom og at testene kan tjene som en indikasjon på aktuell infeksjon der hvor blodkultur og biopsi forblir negativ.^{1,3} Men mange er fortsatt avventende til nytten av disse og andre surrogatmarkører ved invasiv candidainfeksjon.⁴ Kombinasjon av begge testene anbefales hos voksne, hos spedbarn holder mannan antigen som markør for mulig candidemi. Mannan og anti-mannan (Candida antigen og -antistoff) tilbys på SSI, i København, men benyttes heller ikke i Sverige (2011). Hvilke tester som bør velges for tidlig påvisning av candidainfeksjon eller for å utelukke aktuell infeksjon vil være avhengig av pasientkategori, speciesdistribusjon og eventuell bruk av profylakse⁶, og konkurrerer nok på sikt med innføring av en effektiv Candida PCR.

Referanser:

- 1: Cuenca-Estrella M et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012. Diagnostic procedures. *Clinical Microbiology and Infection* 2012;18 (Suppl. 9–18
- 2: Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care* 2010;14:R222.
- 3: Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: How non-culture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis.* (2013) 56 (9): 1284-1292.
- 4: Bille J. New nonculture-based methods for the diagnosis of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care.* 2010;16(5):460–4.
- 5: Oliveri S, Trovato L, Betta P, Romeo MG, Nicoletti G. Experience with the Platelia Candida ELISA for the diagnosis of invasive candidosis in neonatal patients. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:391-393.⁵

6: Held J, Kohlberger I, Rappold E, Busse Grawitz A, Hacker G. Comparison of (1->3)-beta-d-glucan, mannan/anti-mannan antibodies, and Cand-Tec Candida antigen as serum biomarkers for candidemia. J Clin Microbiol 2013; 51: 1158-1164.

2.6.6 Antistoffpåvisning:

Aspergillus antistoff

Påvisning av Aspergillus antistoff kan være uttrykk for aktuell infeksjon, tidligere infeksjon eller sensibilisering. Påvisning av ulike antistoff mot sopparter utføres i stor grad av immunologene (IgE og IgG) avhengig av klinisk problemstilling. "Aspergillus antistoff" kan være en IgG antistoffpåvisning ved ELISA eller påvisning av aspergillus presipiterende antistoff ved dobbeldiffusjon, hvor sistnevnte er ikke en ren IgG test. Ved påvisning av antistoff utføres en titerbestemmelse, enten mot det aktuelle agens eller Aspergillus fumigatus katalase antistoff som anses som et svært spesifikt antistoff ved infeksjon.

De beste IgG testene skal ha 90-95 % sensitivitet ved kronisk pulmonal aspergillose og aspergillomer, og er mye mer sensitive enn oppvekst i kultur, men for å stille diagnosen må typisk radiologi foreligge hos en relativt immunkompetent pasient. Titer varierer. Det beskrives et langsomt fall i titer selv ved adekvat behandling.

Aspergillusantistoff kan også påvises også hos 30-50 % av pasientene med ABPA, ofte med lave titer, noe som også kan finnes ved andre tilstander med sensibilisering mot sopp (hypersensitivitetspneumonitt, allergisk alveolitt, SAFS (Severe asthma with fungal sensitization) med og uten samtidige IgE antistoff. Påvisning av aspergillus antistoff og eventuelt titer er ikke alene diagnostisk for noen av disse tilstandene.

Aspergillusantistoff har vært ansett som med lite aktuell undersøkelse hos immunosupprimerte pasienter. Dette stemmer hos nøytropene, men undersøkelsen har fått noe utbredelse i andre pasientgrupper, også ved spørsmål om invasiv sykdom, men uten entydige anbefalinger så langt.

Referanser:

LIFE <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases/antibody-testing/>

1: Schonheyder H, Andersen P, Petersen JC. Rapid immunoelectrophoretic assay for detection of serum antibodies to Aspergillus fumigatus catalase in patients with pulmonary aspergillosis. Eur J Clin Microbiol 1985;4:299-303.

Antistoff mot dimorf sopp

Påvisning av presipiterende antistoff mot *Histoplasma capsulatum* *Coccidioides immitis* og *Blastomycose dermatidis* hos pasienter med invasiv sykdom. Kan være negative ved uttalt immunsvikt og tidlig i forløpet. Serokonversjon kan kreve 2-6 uker. Se innlegg om dimorf sopp. Testene utføres på OUS Rikshospitalet ved behov. Vi har tilbudt disse siden vi overtok referansefunksjonen for mykologi, men vi får ikke mange prøver og har sjelden positive prøver, ikke uventet da dette ikke er hyppig forekommende sykdommer i vår del av verden.

2.6.7 Påvisning av metabolitter:

D/L-arabinitol (utføres ikke i Norge)

D- arabinitol produseres av de fleste Candidaarter med unntak av *C. glabrata* og *C. krusei* og kan påvises i serum og kroppsvæsker hos pasienter med infeksjon. D/L-arabinitol produseres også i menneskekroppen, og utskilles via nyrene. Begge typer arabinol kan påvises gass-kromatografisk og arabinolkvosienten i urinen har vist seg å korrelere med invasiv candida-infeksjon hos nøytropene pasienter og hos nyfødte, men sensitivitet og spesifisitet varierer i

ulike studier og ulike pasientpopulasjoner. Metoden er relativt utbredt i Sverige, men utføres ikke i Norge.

Referanser:

Arabinitol ratio in urine for early diagnosis of Candidiasis infection *Lakartidningen* 2008 Nov 26-Dec 9;105(48-49):3537-8.

2.7 Molekylærbiologiske undersøkelser ved sopp- infeksjoner

Fredrik Müller, Mikrobiologisk avdeling, OUS Rikshospitalet

Bakgrunn

Molekylærbiologiske undersøkelser har så langt hatt en noe begrenset plass innen diagnostisk mykologi.

Imidlertid er et stort antall soppsekvenser tilgjengelig. Dessuten har dyrkning ofte begrenset sensitivitet. Tidlig påvisning av sopp er særlig viktig ved invasive soppinfeksjoner hos immunosupprimerte pasienter. Alt dette taler for økt bruk av molekylære metoder for påvisning av sopp.

Det er en del utfordringer knyttet til valg av prøvemateriale, optimalisering av forbehandling og ekstraksjon, kontaminering fra sopparter i miljøet og liten grad av standardiserte metodikker.

2.7.1 Prøvemateriale, forbehandling og ekstraksjon

Valg av fullblod eller serum (eventuelt plasma) er fortsatt kontroversielt. Enkelte sammenliknende studier har vist at serum ikke kommer dårligere ut enn fullblod vurdert ved *Candida* PCR (1) og *Aspergillus* PCR (2), men dette er ikke endelig klarlagt (3). Flere studier anbefaler bruk av et stort prøvevolum i størrelsesorden 1-3 mL blod eller serum (1;2;4-7). Ved bruk av blod synes EDTA å være akseptabelt som antikoagulant, mens det er observert hemning av PCR-reaksjonen (*Aspergillus* PCR) ved bruk av citrat eller heparin (8).

Bronkial skyllevæske bør sentrifugeres og DNA ekstraheres fra pellet (9).

Sopp har en robust cellevegg som stiller krav til effektiv lysis med enzymatiske og/eller mekaniske metoder. The "European *Aspergillus* PCR Initiative" (EAPCRI) har satt opp mekanisk forbehandling ("bead beating") for lysis av cellevegg som et viktig trinn i prøvebehandlingen (4;10). Ved bruk av enzymatisk behandling er det viktig å være oppmerksom på at både proteinase K og lytikase (spalter 1-3- β -glukan og har proteaseaktivitet) kan være kontaminert med sopp DNA (11).

Sammenlikning av metoder for ekstraksjon av DNA fra *Candida albicans* og *Aspergillus fumigatus* har vist store forskjeller i utbytte, og det var ikke de samme metodene som egnet seg best for hhv *Candida albicans* og *Aspergillus fumigatus* (11).

DNA i formalinfiksert og parafininnstøpt materiale vil ofte være delvis degradert og det kan være problemer med PCR-inhibitorer i materialet (12). Forbehandling og ekstraksjon av slikt materiale for påvisning av sopp-DNA krever spesielle protokoller (13). Flere studier har anvendt DNA-sekvensering for påvisning av sopp (13) samt spesifikke PCR-metoder til påvisning av bl a *Aspergillus* (14), *Zygomycetes* (14) og *Histoplasma* (15) fra parafininnstøpt materiale med godt resultat. For ekstraksjon av muggsopp som f eks *Aspergillus* sp. kreves bruk av lytikase for vellykket DNA-ekstraksjon (13;16).

2.7.2 Amplifiseringsmetoder for påvisning av ett – noen få agens

Stort sett anvendes PCR-metodikk i form av sanntids PCR for påvisning av spesifikt sopp-DNA. Ofte velges multikopigener for økt sensitivitet, som f.eks. 18S, 28S, ITS1 og ITS2 rDNA gener og enkelte mitokondrielle gener (17). Selv om det eksisterer enkelte kommersielt tilgjengelige PCR-”kits”, anvendes i stor grad ”in house” analyser. I QCMD-utsendinger for 2012 brukte hhv. 20 % og 13 % kommersielle ”kits” for påvisning av *Pneumocystis jirovecii* og *Aspergillus* sp. (<http://www.qcmd.org/>). Det er betydelig behov for standardisering og dokumentasjon av de forskjellige PCR-metodene. Det finnes en rekke generelle krav til PCR-metodikk som er nyttig i validering og utvikling av nye metoder (18;19).

For øvrig har fluorescens in situ hybridisering (FISH) vært anvendt for påvisning av *Candida* sp. fra positive blodkulturer med godt resultat (20-22). Mye taler for at denne anvendelsen etter hvert vil bli erstattet av MALDI-ToF direkte fra blodkultur.

Candida species

Påvisning av *Candida* DNA er hovedsakelig knyttet til påvisning i blod, som oppsummert i en meta-analyse av Avni og medarbeidere (23). De konkluderer med at PCR har høyere sensitivitet enn dyrkning og at bruk av PCR er velegnet for tidlig påvisning av *Candida* sp. i blod hos risikopasienter.

Aspergillus species

Molekylærdiagnostisk *Aspergillus*-diagnostikk har særlig vært rettet mot påvisning av *Aspergillus* DNA i blod og nedre luftveisprøver. I en meta-analyse fra 2009 har Mengoli og medarbeidere gjennomgått litteraturen når det gjelder påvisning i blod og konkludert med at negativt funn i én prøve var nok til å avkrefte mistanke om invasiv aspergillose, mens det var behov for positive funn i to prøver for å bekrefte funn av invasiv sykdom (24). De etterlyste ellers en standardisering av PCR-diagnostikken. Det arbeides med slik standardisering gjennom EAPCRI (4;10).

Når det gjelder *Aspergillus* DNA påvisning i bronkial skyllevæske, ble det utført en meta-analyse i 2007 der det ble konkludert med at metoden var nyttig hos risikopasienter, men at det var utfordringer knyttet til kontaminering med *Aspergillus* sp. fra miljøet og til valg av primere og metodikk for øvrig (25).

Dermatofytter

PCR-metodikk har høyere sensitivitet og er betydelig raskere enn dyrkning av dermatofytter, og det foreligger en rekke studier der dermatofytt DNA er påvist ved hjelp av spesifikke prober, eller ved bruk av SYBR Green (26-31).

Pneumocystis jirovecii

Som beskrevet i annet innlegg på Strategimøtet, anvender de fleste multi-kopigener som mt rLSU (mitochondrial ribosome large sub-unit) og MSG (major surface glycoprotein) som målgen for PCR. Da *P. jirovecii* kan kolonisere luftveiene, er tolkning av positivt PCR-resultat vanskelig. Semikvantitativ/kvantitativ PCR-metodikk sammenholdt med immunmorfologisk diagnostikk muliggjør en vurdering av om funn representerer infeksjon eller kolonisering (32).

Andre sopparter

Det henvises til omfattende litteratur om DNA-basert påvisning av mer uvanlige sopparter.

2.7.3 Metoder for bredere påvisning av forskjellige sopparter

For genotypisk påvisning av sopp i prøvemateriale, er sekvensering av ITS-området anbefalt som primærmethode (33) og dette er også vedtatt av "The International Sub-commission on Fungal Barcoding" (<http://www.allfungi.com/its-barcode.php>). Samme metode kan også anvendes ved identifisering av sopp etter dyrkning. Oppløsningsevnen er noe varierende og for enkelte sopp kan oppløsningsevnen økes ved sekundær bruk av andre målgener som 28S D1/D2 (gjærsopp, dimorfe sopp, Zygomycetes, dermatofytter), EF-1 α (*Fusarium*) eller β -tubulin (*Aspergillus*, *Pseudallescheria boydii*, *Phaeoacremonium*, *Penicillium marneffei*) (34). Kvaliteten på ITS-sekvensene i forskjellige databaser er varierende og kompliseres ytterligere av en uoversiktlig nomenklatur med ulike navn på ukjønnete og kjønnete former innen Ascomycota og Basidiomycota (35). Amsterdam-deklarasjonen for soppnomenklatur gikk i 2011 inn for en endring der alle sopparter skulle få *ett* navn ("One fungus = One name") (35), noe som vil forenkle nomenklaturen.

I GenBank (36) finnes i størrelsesorden 170.000 sopp ITS-sekvenser, men kvaliteten er varierende. Flere har ønsket andre databaser med strengere krav til validering av de sekvenser som importeres i databasen. ISHAM ("International Society for Human and Animal Mycology; <http://www.isham.org/>) har engasjert seg i dette arbeidet og bygger opp en database med strengt validerte ITS soppsekvenser (<http://www.mycologylab.org>).

Andre metoder for bredere påvisning av forskjellige sopparter omfatter Luminex-teknologi (37-39) og mikromatrise-metoder (40;41). Bruk av PCR sammen med massespektrometri ("Electrospray Ionisation Time of Flight"; ESI-ToF) har vært kommersielt tilgjengelig (Plex-ID, Abbott) og har vært anvendt i noen publikasjoner (42-44). Multiplex PCR har også vært anvendt til påvisning av DNA fra sopp (og bakterier) i blod, bl a ved bruk av det kommersielle SeptiFast-systemet fra Roche (45;46).

I de kommende år vil dypsekvensering ("Next-generation sequencing") få økende utbredelse i identifikasjon, genotypisk resistensbestemmelse og typing av mikroorganismer, inklusive sopp (47). Imidlertid er metodene ennå såpass omfattende at det vil ta tid før de finner sin plass i diagnostisk mykologi.

2.7.4 Genotypisk resistensbestemmelse

Sekvensering for kartlegging av punktmutasjoner som bidrar til resistens mot soppmidler kan være aktuelt bl a ved funn av fenotypisk azolresistens hos *Aspergillus* sp. (48;49) og ved undersøkelse av sulfaresistens hos *Pneumocystis jirovecii* (32).

2.7.5 Eksterne kvalitetskontroller

For enkelte agens er eksterne kvalitetskontroller kommersielt tilgjengelige. "Quality Control for Molecular Diagnostics" (QCMD; <http://www.qcmd.org>) sender ut årlige kontroller for *Aspergillus* sp. DNA og *P. jirovecii* DNA. *P. jirovecii* DNA er også tilgjengelig fra Instand (<http://www.instandev.de/en/>). Fra "United Kingdom National External Quality Assessment Service (UKNEQAS) for Microbiology" (<http://www.ukneqasmicro.org.uk>) er kvalitetskontroll for soppdyrkning tilgjengelig og denne kan brukes til genotypisk soppidentifikasjon etter dyrkning ved f eks ITS-sekvensering.

2.7.6 Konklusjon

Molekylærdiagnostikk er et nyttig tillegg til annen diagnostikk for påvisning av sopp, særlig ved invasive mykoser. Metodene vil sannsynligvis få økende betydning de kommende år. Et tilstrekkelig prøvevolum, samt korrekt forbehandling og nukleinsyre-ekstraksjon er helt nødvendige forutsetninger for et godt resultat. Det forventes bedre retningslinjer og standardisering på dette området.

Også valg av målgen(er) og retningslinjer for utførelse av amplifiseringsreaksjonen (PCR eller tilsvarende) forventes bedre standardisert fremover.

Påvisning av bl a *Candida* DNA og *Aspergillus* DNA ved invasive mykoser har bedre sensitivitet enn andre metoder. Påvisning av *Pneumocystis jirovecii* DNA er en viktig del av *Pneumocystis*-diagnostikken (sammen med immunmorfologisk metodikk).

Sekvensering av ITS1/2 med eventuelt tillegg av andre målgener er velegnet for identifikasjon av sopparter der en ikke kommer til målet med fenotypiske metoder.

Lokalt pasientgrunnlag og etterspørsel etter molekylærdiagnostikk innen mykologi må være avgjørende for hvilke laboratorier som tar opp metodene, eller velger å sende prøver til annet laboratorium der disse metodene er i bruk.

Referanser:

1. Lau,A., Halliday,C., Chen,S.C., Playford,E.G., Stanley,K., and Sorrell,T.C. 2010. Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR. *J. Clin. Microbiol.* **48**:811-816.
2. Springer,J., Morton,C.O., Perry,M., Heinz,W.J., Paholcsek,M., Alzheimer,M., Rogers,T.R., Barnes,R.A., Einsele,H., Loeffler,J. et al 2013. Multicenter comparison of serum and whole-blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA in high-risk hematological patients. *J. Clin. Microbiol.* **51**:1445-1450.
3. Khot,P.D., and Fredricks,D.N. 2009. PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **7**:1201-1221.
4. White,P.L., Bretagne,S., Klingspor,L., Melchers,W.J., McCulloch,E., Schulz,B., Finnstrom,N., Mengoli,C., Barnes,R.A., Donnelly,J.P. et al 2010. *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. *J. Clin. Microbiol.* **48**:1231-1240.
5. Millon,L., Larosa,F., Lepiller,Q., Legrand,F., Rocchi,S., Daguindau,E., Scherer,E., Bellanger,A.P., Leroy,J., and Grenouillet,F. 2013. Quantitative polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.* **56**:e95-101.
6. Suarez,F., Lortholary,O., Buland,S., Rubio,M.T., Ghez,D., Mahe,V., Quesne,G., Poiree,S., Buzyn,A., Varet,B. et al 2008. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance. *J. Clin. Microbiol.* **46**:3772-3777.
7. Loonen,A.J., Bos,M.P., van,M.B., Neerken,S., Catsburg,A., Dobbelaer,I., Penterman,R., Maertens,G., van de,W.P., Savelkoul,P. et al 2013. Comparison of pathogen DNA isolation methods from large volumes of whole blood to improve molecular diagnosis of bloodstream infections. *PLoS. One.* **8**:e72349.
8. Garcia,M.E., Blanco,J.L., Caballero,J., and Gargallo-Viola,D. 2002. Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1567-1568.
9. Khot,P.D., Ko,D.L., Hackman,R.C., and Fredricks,D.N. 2008. Development and optimization of quantitative PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *BMC. Infect. Dis.* **8**:73.
10. <http://www.eapcri.eu/> 2013. The European *Aspergillus* PCR Initiative.
11. Fredricks,D.N., Smith,C., and Meier,A. 2005. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* **43**:5122-5128.
12. Klopffleisch,R., Weiss,A.T., and Gruber,A.D. 2011. Excavation of a buried treasure--DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Histol. Histopathol.* **26**:797-810.
13. Munoz-Cadavid,C., Rudd,S., Zaki,S.R., Patel,M., Moser,S.A., Brandt,M.E., and Gomez,B.L. 2010. Improving molecular detection of fungal DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissues: comparison of five tissue DNA extraction methods using panfungal PCR. *J. Clin. Microbiol.* **48**:2147-2153.

14. Bialek,R., Konrad,F., Kern,J., Aepinus,C., Cecenas,L., Gonzalez,G.M., Just-Nubling,G., Willinger,B., Presterl,E., Lass-Flörl,C. et al 2005. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. *J. Clin. Pathol.* **58**:1180-1184.
15. Koepsell,S.A., Hinrichs,S.H., and Iwen,P.C. 2012. Applying a real-time PCR assay for *Histoplasma capsulatum* to clinically relevant formalin-fixed paraffin-embedded human tissue. *J. Clin. Microbiol.* **50**:3395-3397.
16. Paterson,P.J., Seaton,S., McLaughlin,J., and Kibbler,C.C. 2003. Development of molecular methods for the identification of aspergillus and emerging moulds in paraffin wax embedded tissue sections. *Mol. Pathol.* **56**:368-370.
17. Springer,J., Einsele,H., and Loeffler,J. 2012. Molecular techniques in the diagnosis of deep and systemic mycosis. *Clin. Dermatol.* **30**:651-656.
18. Bustin,S.A., Benes,V., Garson,J.A., Hellemans,J., Huggett,J., Kubista,M., Mueller,R., Nolan,T., Pfaffl,M.W., Shipley,G.L. et al 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**:611-622.
19. Standard Unit, Microbiology Services Division, HPA. 2012. Good Laboratory Practice when Performing Molecular Amplification Assays. Quality Guidance Q 4, 1-13.
20. Alexander,B.D., Ashley,E.D., Reller,L.B., and Reed,S.D. 2006. Cost savings with implementation of PNA FISH testing for identification of *Candida albicans* in blood cultures. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **54**:277-282.
21. Forrest,G.N., Mankes,K., Jabra-Rizk,M.A., Weekes,E., Johnson,J.K., Lincalis,D.P., and Venezia,R.A. 2006. Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization-based identification of *Candida albicans* and its impact on mortality and antifungal therapy costs. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3381-3383.
22. Hall,L., Le Febvre,K.M., Deml,S.M., Wohlfiel,S.L., and Wengenack,N.L. 2012. Evaluation of the Yeast Traffic Light PNA FISH probes for identification of *Candida* species from positive blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* **50**:1446-1448.
23. Avni,T., Leibovici,L., and Paul,M. 2011. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Microbiol.* **49**:665-670.
24. Mengoli,C., Cruciani,M., Barnes,R.A., Loeffler,J., and Donnelly,J.P. 2009. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **9**:89-96.
25. Tuon,F.F. 2007. A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples. *Rev. Iberoam. Micol.* **24**:89-94.
26. Brillowska-Dabrowska,A., Saunte,D.M., and Arendrup,M.C. 2007. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1200-1204.
27. Bergmans,A.M., van der,E.M., Klaassen,A., Bohm,N., Andriess,G.I., and Wintermans,R.G. 2010. Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**:704-710.
28. Luk,N.M., Hui,M., Cheng,T.S., Tang,L.S., and Ho,K.M. 2012. Evaluation of PCR for the diagnosis of dermatophytes in nail specimens from patients with suspected onychomycosis. *Clin. Exp. Dermatol.* **37**:230-234.
29. Bergman,A., Heimer,D., Kondori,N., and Enroth,H. 2013. Fast and specific dermatophyte detection by automated DNA extraction and real-time PCR. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**:E205-E211.
30. Arabatzis,M., Bruijnesteijn van Coppenraet,L.E., Kuijper,E.J., de Hoog,G.S., Lavrijsen,A.P., Templeton,K., van der Raaij-Helmer EM, Velegriaki,A., Graser,Y., and Summerbell,R.C. 2007. Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. *Br. J. Dermatol.* **157**:681-689.
31. Miyajima,Y., Satoh,K., Uchida,T., Yamada,T., Abe,M., Watanabe,S., Makimura,M., and Makimura,K. 2013. Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes. *J. Dermatol. Sci.* **69**:229-235.
32. Müller,F. 2013. *Pneumocystis jirovecii*. In *Strategimote 2013: Medisinsk mykologi*.
33. Schoch,C.L., Seifert,K.A., Huhndorf,S., Robert,V., Spouge,J.L., Levesque,C.A., and Chen,W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **109**:6241-6246.
34. Petti,C.A., Bosshard,P.P., Brandt,M.E., Clarridge,J.E.I., Feldblyum,T.V., Foxall,P., Furtado,M.R., Pace,N., and Procop,G. 2008. Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline (CLSI). Clinical and Laboratory Standards Institute. 1-73.
35. Hawksworth,D.L., Crous,P.W., Redhead,S.A., Reynolds,D.R., Samson,R.A., Seifert,K.A., Taylor,J.W., Wingfield,M.J., Abaci,O., Aime,C. et al 2011. The amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA Fungus.* **2**:105-112.

36. Benson,D.A., Cavanaugh,M., Clark,K., Karsch-Mizrachi,I., Lipman,D.J., Ostell,J., and Sayers,E.W. 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res.* **41**:D36-D42.
37. Buelow,D.R., Gu,Z., Walsh,T.J., and Hayden,R.T. 2012. Evaluation of multiplexed PCR and liquid-phase array for identification of respiratory fungal pathogens. *Med. Mycol.* **50**:775-780.
38. Balada-Llasat,J.M., Larue,H., Kamboj,K., Rigali,L., Smith,D., Thomas,K., and Pancholi,P. 2012. Detection of yeasts in blood cultures by the Luminex xTAG fungal assay. *J. Clin. Microbiol.* **50**:492-494.
39. Preuner,S., and Lion,T. 2013. Species-specific identification of a wide range of clinically relevant fungal pathogens by the Luminex((R)) xMAP technology. *Methods Mol. Biol.* **968**:119-139.
40. Liao,M.H., Lin,J.F., and Li,S.Y. 2012. Application of a multiplex suspension array for rapid and simultaneous identification of clinically important mold pathogens. *Mol. Cell Probes* **26**:188-193.
41. Farina,C., Russello,G., Andreoni,S., Bonetti,C., Conte,M., Fazi,P., Lombardi,G., Luzzaro,F., Manso,E., Marone,P. et al 2012. Microarray technology for yeast identification directly from positive blood cultures. A multicenter Italian experience. *Med. Mycol.* **50**:549-555.
42. Simner,P.J., Uhl,J.R., Hall,L., Weber,M.M., Walchak,R.C., Buckwalter,S., and Wengenack,N.L. 2013. Broad-range direct detection and identification of fungi by use of the PLEX-ID PCR-electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) system. *J. Clin. Microbiol.* **51**:1699-1706.
43. Massire,C., Buelow,D.R., Zhang,S.X., Lovari,R., Matthews,H.E., Toleno,D.M., Ranken,R.R., Hall,T.A., Metzgar,D., Sampath,R. et al 2013. PCR followed by electrospray ionization mass spectrometry for broad-range identification of fungal pathogens. *J. Clin. Microbiol.* **51**:959-966.
44. Gu,Z., Hall,T.A., Frinder,M., Walsh,T.J., and Hayden,R.T. 2012. Evaluation of repetitive sequence PCR and PCR-mass spectrometry for the identification of clinically relevant *Candida* species. *Med. Mycol.* **50**:259-265.
45. Lucignano,B., Ranno,S., Liesenfeld,O., Pizzorno,B., Putignani,L., Bernaschi,P., and Menichella,D. 2011. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J. Clin. Microbiol.* **49**:2252-2258.
46. Lefort,A., Chartier,L., Sendid,B., Wolff,M., Mainardi,J.L., Podglajen,I., snos-Ollivier,M., Fontanet,A., Bretagne,S., and Lortholary,O. 2012. Diagnosis, management and outcome of *Candida* endocarditis. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**:E99-E109.
47. Dunne,W.M., Jr., Westblade,L.F., and Ford,B. 2012. Next-generation and whole-genome sequencing in the diagnostic clinical microbiology laboratory. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**:1719-1726.
48. Arendrup,M.C., Jensen,R.H., Grif,K., Skov,M., Pressler,T., Johansen,H.K., and Lass-Flörl,C. 2012. In vivo emergence of *Aspergillus terreus* with reduced azole susceptibility and a Cyp51a M217I alteration. *J. Infect. Dis.* **206**:981-985.
49. Camps,S.M., Rijs,A.J., Klaassen,C.H., Meis,J.F., O'Gorman,C.M., Dyer,P.S., Melchers,W.J., and Verweij,P.E. 2012. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates harboring the TR34/L98H azole resistance mechanism. *J. Clin. Microbiol.* **50**:2674-2680.

2.8 Identifisering av sopp ved hjelp av MALDI TOF masse-spektrografi

André Ingebretsen, Oslo universitetssykehus RH, Avd. for mikrobiologi og Avd. for smittevern

Fenotypisk identifisering av mikroorganismer har lenge vært avhengig av en kombinasjon av gramfarging, oksygenkrav, karbohydratmetabolisme og tilstedeværelse av diverse enzymer. De siste årene har imidlertid identifisering ved hjelp av MALDI TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) massespektrometri vært på fremmarsj og erstattet mange av disse testene(1). Det er mye grunnet metodens effektive arbeidsflyt, hurtige analysetid(2) og lave kostnad at flere og flere laboratorier investerer i en MALDI TOF MS plattform(3, 4). Metoden kan generelt sammenlignes med DNA-sekvensering når det gjelder identifisering og det hevdes at MALDI TOF MS er på vei til å bli en universalmetode for å kunne identifisere både prokaryoter og eukaryoter(5). Det som er avgjørende for hvilke arter en kan identifisere og for hvor god oppløsning metoden har på subart-nivå er i hovedsak to variabler; proteinekstraksjon og antall referansespektre i identifikasjonsdatabasen. Kommersielle databaser fra Bruker Daltonics (MALDI Biotyper) og fra Biomerieux (Vitek MS/SARAMIS) er inkludert når man kjøper en MALDI TOF MS plattform til identifisering av

mikroorganismer. Disse har som standard en rekke referansespektre av klinisk viktige sopparter. I tillegg har Bruker Daltonics en egen database med filamentøse sopparter som man kan kjøpe. Databasene er bygd opp ved at man bruker en standard etanol-maursyre ekstraksjon kombinert med HCCA-matriks. Det er også dette leverandørene av databasene anbefaler at man bruker til identifikasjon. Det har imidlertid vist seg at man kan få gode spektre med ”direkte metode” og ”utvidet direkte metode”, men at dette er artsavhengig (6, 7).

Gjærsopp

Selv om det er rapportert om høy positiv ID- prosent og korrekt ID-prosent for identifisering av gjærsopp så gjelder dette stort sett for *Candida* sp (7, 8). For non-*Candida* gjærsopp (*Geotrichum*, *Trichosporon*) identifiseres kun mellom 41 % og 61 % av isolatene. Dette reflekterer innholdet i referansedatabasene. Genus som er dårlig dekket i referansedatabasene inkluderer *Aurobasidium*, *Geotrichum* og *Pichia*. Løsningen på dette er å selv legge til referansespektre i referansedatabasen. Ved å gjøre dette har MALDI TOF MS vist seg å kunne identifisere artene *Cryptococcus neoformans* og *Cryptococcus gatti* godt. Og teknikken kan også brukes til å skille variantene *C.neoformans* var.*grubii* og *C.neoformans* var.*neoformans* fra hverandre(9). Skal man konstruere et eget bibliotek er det ikke bare viktig å inkludere mange forskjellige arter, men også mange forskjellige stammer av samme art. Forskjeller mellom stammer av samme art kan ha mye å si i MALDI TOF MS identifisering (10). Inkludering av mange forskjellige stammer av samme art muliggjør også subtyping av arten. Det er gjort forsøk på subtyping av gjærsopp i utbruddssammenheng (11), men dette vil bli mer utbredt idet databasene vokser og man får flere åpne databaser. Korrekt identifisering av gjærsopp direkte i fra positive blodkulturer kan hjelpe til med valg av antifungal terapi 24 - 48 timer tidligere enn identifisering fra subkultur. Det finnes flere metoder for å analysere gjærsopp direkte fra positive blodkulturer inkludert et kommersielt kit(12, 13). Metodene fungerer godt så lenge de positive blodkulturene ikke er polymikrobielle eller at antall mikrober er over grenseverdien ($5,9 \times 10^5$ CFU/ml) for identifisering ved hjelp av MALDI TOF MS.

Identifisering av muggsopp og dermatofytter

Som for gjærsopp er identifisering av muggsopp og dermatofytter avhengig av proteinekstraksjon og databaseinnhold(14-16). Bruker Daltonics har utviklet en egen database for filamentøse sopper. Denne inneholder 366 stammer fra 129 arter. ”Direkte metode” der man tar biomateriale fra front mycel har vist seg brukbar til identifikasjon av *Aspergillus* sp og dermatofytter.

Resistenstesting

Det er gjort forsøk på resistenstesting på både *Candida* sp og *Aspergillus* sp, men dette trenger mer dokumentasjon og videreutvikling (17-19).

Referanser:

1. Seng P, Drancourt M, Gourié F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009 Aug 15;49(4):543-51. PubMed PMID: 19583519. Epub 2009/07/09. eng.
2. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS microbiology reviews*. 2012 Mar;36(2):380-407. PubMed PMID: 22092265. Epub 2011/11/19. eng.

3. Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.* 2010 Nov;5(11):1733-54. PubMed PMID: 21133692. Epub 2010/12/08. eng.
4. Santos C, Paterson RR, Venancio A, Lima N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of applied microbiology.* 2010 Feb;108(2):375-85. PubMed PMID: 19659699. Epub 2009/08/08. eng.
5. Dridi B, Raoult D, Drancourt M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of Archaea: towards the universal identification of living organisms. *APMIS.* 2012;120(2):85-91.
6. Iriart X, Lavergne RA, Fillaux J, Valentin A, Magnaval JF, Berry A, et al. Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight system with a new time-effective strategy. *J Clin Microbiol.* 2012 Jun;50(6):2107-10. PubMed PMID: 22495559. Pubmed Central PMCID: PMC3372123. Epub 2012/04/13. eng.
7. Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2011 Sep;17(9):1359-65. PubMed PMID: 20946411. Epub 2010/10/16. eng.
8. Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates. *Journal of Clinical Microbiology.* 2009 September 1, 2009;47(9):2912-7.
9. McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A, Zhang SX. Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011 Aug;49(8):3050-3. PubMed PMID: 21653762. Pubmed Central PMCID: PMC3147715. Epub 2011/06/10. eng.
10. Pinto A, Halliday C, Zahra M, van Hal S, Olma T, Maszewska K, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Identification of Yeasts Is Contingent on Robust Reference Spectra. *PLoS ONE.* 2011;6(10):e25712.
11. Pulcrano G, Roscetto E, Iula VD, Panellis D, Rossano F, Catania MR. MALDI-TOF mass spectrometry and microsatellite markers to evaluate *Candida parapsilosis* transmission in neonatal intensive care units. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology.* 2012 Nov;31(11):2919-28. PubMed PMID: 22644055. Epub 2012/05/31. eng.
12. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D'Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, et al. Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry Assay of Blood Culture Broths for Rapid Identification of *Candida* Species Causing Bloodstream Infections: an Observational Study in Two Large Microbiology Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology.* 2012 January 1, 2012;50(1):176-9.
13. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, et al. Improved Identification of Yeast Species Directly from Positive Blood Culture Media by Combining Sepsityper Specimen Processing and Microflex Analysis with the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Biotyper System. *Journal of Clinical Microbiology.* 2011 July 1, 2011;49(7):2528-32.
14. Cassagne C, Ranque S, Normand A-C, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE.* 2011;6:e28425. PubMed PMID: doi:10.1371/journal.pone.0028425.
15. Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM, Zelazny AM. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013 Mar;51(3):828-34. PubMed PMID: 23269728. Pubmed Central PMCID: PMC3592033. Epub 2012/12/28. eng.
16. Normand A-C, Cassagne C, Ranque S, L'Ollivier C, Fourquet P, Roesems S, et al. Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC Microbiology.* 2013;13(1):76. PubMed PMID: doi:10.1186/1471-2180-13-76.
17. Marinach C, Alanio A, Palous M, Kwasek S, Fekkar A, Brossas JY, et al. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and

fluconazole. *Proteomics*. 2009 Oct;9(20):4627-31. PubMed PMID: 19750514. Epub 2009/09/15. eng.

18. Vella A, De Carolis E, Vaccaro L, Posteraro P, Perlin DS, Kostrzewa M, et al. Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis. *J Clin Microbiol*. 2013 Sep;51(9):2964-9. PubMed PMID: 23824764. Pubmed Central PMCID: PMC3754633. Epub 2013/07/05. eng.

19. De Carolis E, Vella A, Florio AR, Posteraro P, Perlin DS, Sanguinetti M, et al. Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Caspofungin Susceptibility Testing of *Candida* and *Aspergillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012 July 1, 2012;50(7):2479-83.

2.9 Resistensbestemmelse av sopp

Maiken Cavling Arendrup, Statens Seruminstitut, København referert av Cecilie Torp Andersen OUS Rikshospitalet

Maiken C Arendrup hadde en omfattende presentasjon på strategimøtet med gjennomgang av bakgrunnsdokumentasjon for fastsettelse av brytningspunkt for sopp, harmonisering av CLSI og EUCAST brytningspunkt, informasjon om likheter og ulikheter ved de to referansemetodene med buljongfortynning og de ulike kommersielle metoder for resistensbestemmelse av sopp.

<http://mikrobiologi.fhi.no/PageFiles/3302/Arendrup%20Susceptibility%20testing%20Oslo%20Nov%202013%20Handouts.pdf>

Hun var nylig førsteforfatter av en oversiktsartikkel med oppdatering av brytningspunkt for antifungale midler hvor mange av hennes tema fra møtet forklares i detalj og med mange nyttige referanser vedrørende resistens og resistensbestemmelse.(1)

Her gjengis en oppsummering av tema fra strategimøtet:

Det er anbefalt at *gjærsoppisolat fra normalt sterile områder og blod* skal resistensbestemmes, i tillegg anbefales resistensbestemmelse ved invasive infeksjoner og slimhinneinfeksjoner *ved behandlingssvikt* og av gjærsoppisolat som vurderes som *klinisk relevante hos pasienter eksponert for antifungale midler*. (2,3)

De ulike candidaartene har et forutsigbart resistensmønster og ervervet resistens er fortsatt svært sjelden i Norge. Rask og korrekt artsbestemmelse vil for de fleste candidainfeksjoner være essensielt for valg av antifungal behandling, men resistensbestemmelsens betydning for håndtering av pasientene og valg av best mulig behandling må antas å øke.

Ervervet azolresistens kan medieres via mutasjoner i target enzym, oppregulering av targetenzym eller effluxpumper og påvises oftest i forbindelse med langvarig azobehandling. Ervervet echinocandinresistens rapporteres også i økende grad internasjonalt, vanligvis etter 2-3 ukers behandling, mediert via mutasjoner i hot-spot genene FKS1 og FKS2.

Minst like bekymringsfullt er en dreining fra infeksjoner med følsomme til infeksjoner med naturlig resistente candidaarter, en trend vi så langt har vært forskånet for i Norge. (4-6) Økende bruk av profylakse og økende bruk av nye bredspektrede antifungale midler kan endre dette.

Resistensbestemmelse av invasive muggsoppisolat bør også utføres, og spesiell årvåkenhet anbefales ved gjennombruddsinfeksjoner, eller ved funn av uvanlige arter. (2,7,8) *Aspergillus fumigatus* er hyppigste agens ved invasive muggsoppinfeksjoner, og har tidligere vært ansett å ha en forutsigbar resistensprofil, men det rapporteres om økende azolresistens i mange europeiske land hvor bla stort forbruk av azoler i landbruket er satt i sammenheng med forekomst av resistens i kliniske isolat hos pasienter som aldri tidligere har fått azolbehandling. (9-11) Det rapporteres også om økende forekomst av ”kryptiske” arter innen

Aspergillus fumigatus komplekset med en høyere andel arter med naturlig forekommende azolresistens og økende forekomst av andre muggsopp med mer resistens eller mindre forutsigbart resistensmønster. (12)

Både CLSI og EUCAST har utviklet referansemeter for resistensbestemmelse av sopp. (13-15) Referansemeterene baserer seg på buljongfortynning, men de er ikke identiske. Det har foregått et omfattende harmoniseringsarbeid, og resultatet av resistensbestemmelsen, den endelige følsomhetskategoriseringen, er med noen unntak uavhengig av hvilken av de 2 referansemeterene som benyttes. For gjærsopp er CLSIs brytningspunkt for anidulafungin og micafungin noe lavere enn de tilsvarende hos EUCAST, men den metoden genererer noe lavere MIC verdier. CLSI har dessuten brytningspunkt for caspofungin, i motsetning til EUCAST og anser ikke som EUCASTs retningslinjer at villtypepopulasjonen til *C.parapsilosis* og *C.guillierimondi* er echinocandin intermediær følsom.(1).

I løpet av få år har EUCAST etablert brytningspunkt for de fleste candidaarter og *Aspergillus fumigatus* og aktuelle soppmidler (16). Det kommer jevnlig oppdateringer med artsspesifikke brytningspunkt etter hvert som tilstrekkelige data foreligger for å beregne disse, og EUCAST har en stor database med MIC distribusjoner for ulike arter og antifungale midler.

(www.eucast.org). EUCAST referansemeter baseres på buljongfortynning i mikrotiterplate, enten med visuell eller automatisert avlesning, men metoden er arbeidsintensiv og lite hensiktsmessig til bruk i rutinelaboratoriene. (17,18)

Kommersiell tester er utviklet for bruk i rutinelaboratoriene og mange av disse er gode til å detektere resistens mot de ulike antifungale midler.(19-24) De er enklere å håndtere, men det er også vist at ulike laboratorier tildels får ulike resultat med samme test, og før man kan benytte EUCAST (eller CLSI) brytningspunkt med en kommersiell test må laboratoriet forsikre seg om at MIC bestemmelsen de utfører speiler den som genereres ved referansemeteren. Dette kan gjøres ved å sammenligne modal MIC og MIC range med MIC distribusjonen for hver art gjengitt i rasjonale-dokumentene på EUCASTs hjemmeside, og må gjøres for alle drug-bug kombinasjoner før brytningspunkt kan adopteres og metoden tas i bruk ved eget laboratorium.

De ulike kommersielle testene på markedet er validert opp mot de ulike referansemeterene, men dokumentasjon varierer noe, især for leverandører av de nyeste testene på markedet.

Den mest benyttede testen i Norge er agardiffusjon. Agardiffusjon med E-test® (bioMérieux) er velprøvd og benyttes på referanselaboratoriet på Rikshospitalet, men avlesning av brytningspunkt, kan være problematisk med bakgrunn i signifikant trailingvekst i hemningssonen især for azolene, noe som kan mistolkes som resistens. Heteroresistens med store kolonier i ellipsen kan også overses eller mistolkes som trailing av en utrenet avleser, og stammen kan feilaktig rapporteres som følsom. Hvilket medium som benyttes har også stor betydning for dette fenomenet. End-point avlesning varierer med ulike agens, og tid for avlesning varierer mellom 24-48 timer avhengig av agens, opp til 78 timer ved kryptokokker. Korrekt avlesning krever derfor både trening og harmonisering med kontroller med referansestammer og kvalitetskontroll av anvendte medier og for resistensbestemmelse.(25) MIC test strip fra Liofilchem® benytter samme testprinsipp.

Diskdiffusjon med lapper er en annen enkel og billigere testmetode som er spesielt egnet for vannløslige soppmidler som 5FC, flukonazol og vorikonazol. For gjærsopp er metoden også egnet for resistensbestemmelse av echinocandiner. Det finnes ikke europeiske brytningspunkt, men CLSIs M 44 A for *IN VITRO* resistensbestemmelse av *CANDIDA* spp og CLSIs M51-A for muggsopp med etablerte brytningspunkt kan benyttes.(26-29) Stort sett genereres følsomhetskategorisering i samsvar med buljongfortynning og andre kommersielle tester.(30-34).

Andre kommersielle testsystem baseres på buljongfortynning med inkorporert fargeomslag i mediet for visuell eller spektrometrisk avlesning, som Sensititre YeastOne® (TREK

Diagnostic Systems), Fungitest® (BioRad), Micronaut®, (MERLIN Diagnostika) Vitek®, (BioMérieux) eller SensiQuattro Candida EU® (Liofilchem). Semi-automatisert avlesning reduserer problemet med subjektiv vurdering av endepunkt, men testene er beheftet med andre utfordringer. Utvalget av antifungale midler og MIC "range" er gitt på forhånd og vil for noen drug-bug kombinasjoner ikke være i harmoni med aktuelle EUCAST brytningspunkt, avhengig av hvilket testsystem som benyttes.

Da det ofte er få stammer med ervervet resistens i evalueringer av de ulike kommersielle testene, og foreløpig også lite påvist resistens i kliniske isolat er det knyttet noe usikkerhet til hvordan kommersielle tester klarer å skille ut resistente stammer.(31,34-37) Det er derfor viktig å ha fokus på gjennombruddsinfeksjoner og persisterende invasive infeksjoner og terskelen for retesting ved terapivikt skal være lav. Feilaktig påvisning av resistens er også problematisk og uventet resistens bør verifiseres.(36) De kommersielle testene kan indikere resistensutvikling, men for å fastslå sikker resistens anbefales det at isolatet retestes på et referanselaboratorium,(38) og på sikt bør påvisning av ulike resistensgener inngå i overvåkingen av resistens hos sopp.(39,40)

Det anbefales at større laboratorier har mulighet for resistensbestemmelse av gjærsopp med en validert kommersiell test i påvente av verifisering fra referanselaboratoriet, men laboratoriet bør ha et visst volum og personellet som utfører testingen bør være skolert for dette, kvalitetssikre resultatene og delta i SLP (NEQAS) for å sikre kompetanse på området. Igjen vil rask og korrekt identifisering av agens være til god hjelp.

EUCAST har etablert metode for resistensbestemmelse av filamentøse sopp (14) og etablert brytningspunkt for blant annet for *A.fumigatus* og amfotericin og azoler. (41) Det er også flere kommersielle tester tilgjengelig på markedet og resistensbestemmelse av viktige kliniske isolat blir stadig viktigere for håndtering av pasienter.(8,17,42) Da erfaringen med resistensbestemmelse av muggsopp ved norske laboratorier er liten, anbefaler vi at dette sentraliseres til referanselaboratoriet, som også står for korrekt artsidentifikasjon og som derved vil få mulighet til epidemiologisk overvåking og overvåking av resistens hos muggsopp i Norge.

Pga økende azolresistens (43) har man i Danmark valgt å benytte en screeningmetode med en kommersielt tilgjengelig 4-brønners plate med 3 ulike azoler i RPMI medium til bruk i primærlaboratoriene før innsending til endelig resistensbestemmelse. På denne måten kan man raskt utelukke resistens og sikre adekvat soppbehandling av pasienten. (44)

Man har i Danmark påvist azolresistens i 8% av *A. fumigatus* isolater fra jordbruket (45) Azolresistens rapporteres i økende grad internasjonalt og flere land har innført overvåking av slik resistens.(46) Azolresistente Aspergillus er også funnet i miljøprøver i Norge, (47) men så langt har vi ikke sett dette i de få kliniske isolatene vi resistensbestemmer, men årvåkenhet anbefales.

Resistensbestemmelsen av mer sjeldne sopparter må fortsatt vurderes med forsiktighet da brytningspunkt ikke foreligger og følsomhetskategorisering derfor blir umulig. Man kan ikke uten videre anta at avlest MIC-verdi kan si noe om forventet behandlingseffekt, og behandlingsanbefalinger må i stor utstrekning basere seg på kjennskap til naturlig forekommende resistens. (48)

Med økende bruk av soppmidler sees en internasjonal økning både av resistente sopparter og økning i ervervet resistens. Resistensbestemmelse av sopp forventes derfor å få økende betydning for adekvat pasientbehandling i tiden som kommer.(49)Rask resistensbestemmelse av soppisolat ved hjelp av genteknologi, MaldiTOF eller flowcytometri vil sannsynligvis også få økt utbredelse da rask påvisning av resistens vil få stor betydning for valg av optimal behandling av kritisk syke pasienter om omfanget av resistente stammer øker. (50-52)

Referanser:

1. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope WW. 2013. Breakpoints for antifungal agents: an update from EUCAST focussing on echinocandins against *Candida* spp. and triazoles against *Aspergillus* spp. *Drug Resist. Updat.* 16:81–95.
2. Arendrup MC, Bille J, Dannaoui E, et al ECIL-3 classical diagnostic procedures for the diagnosis of invasive fungal diseases in patients with leukaemia Bone Marrow Transplantation (2012) 47, 1030–1045
3. Cuenca-Estrella M et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012. Diagnostic procedures. *Clinical Microbiology and Infection* 2012; 18 (Suppl. 7), 9–18
4. Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* Feb 2011; 55(2): 532–538.
5. Arendrup MC (2013) *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Danish medical journal* 60: B4698.
6. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med.* 2012;125:S3–S13.
7. Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, Ráčil Z, Richardson M, Rogers TR Detection and investigation of invasive mould disease: *Antimicrob. Chemother.* (2011) 66 (suppl 1): i15-i24.)
8. Lass-Flörl C. In vitro susceptibility testing in *Aspergillus* species: an update. *Future Microbiol.* 2010;5:789–799.
9. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC et al. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1068–1076.
10. Snelders E, Camps SMT, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Kema GHJ, van der Lee HA, Klaassen CH, Melchers WJG, Verweij PE. 2012. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 7:e31801.
11. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, Laverdiere M, Arendrup MC, Perlin DS, Denning DW. 2009. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg. Infect. Dis.* 15:1068–1076.)
12. Van Der Linden JWM, Warris A, Verweij PE. 2011. *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Med. Mycol.* 49(Suppl 1):S82–S89.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Third Edition, CLSI document M27-A3[28]. 2008. Clinical and laboratory Standards Institute: Pennsylvania, USA.
14. Rodriguez-Tudela JL, Donnelly JP, Arendrup MC, Arikan S, Barchiesi F, Bille J et al. EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 982–984.
15. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST) *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:E246–E247.
16. Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Lass-Flörl C. EUCAST breakpoints for antifungals. *Drug News Perspect* 2010; 23: 93–97.
17. Lass-Flörl C, Perkhofér S, Mayr A. In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses* 2010;53:1-11.
18. Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M. EUCAST and CLSI: How to assess in vitro susceptibility and clinical resistance. *Curr Fungal Infect Rep.* 2012;6:229–234.
19. Cuenca-Estrella, M., Gomez-Lopez, A., Alastruey-Izquierdo, A., Bernal-Martinez, L., Cuesta, I., Buitrago, M.J., Rodriguez-Tudela, J.L., 2010. Comparison of the Vitek2 antifungal susceptibility system with the Clinical and laboratory StandardsInstitute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth microdilution reference methods and with the

- sensititre yeastone and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1782–1786.
20. Cuenca-Estrella, M., Gomez-Lopez, A., Mellado, E., Rodriguez-Tudela, J.L., 2005. Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 486–492.
 21. Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, Hanson KE, Anstrom KJ, Perfect JR et al. Comparative evaluation of Etest and sensititre yeastone panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 698–706.
 22. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3522–3528.
 23. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 yeast susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing fluconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 796–802.
 24. Dannaoui E, Paugam A, Develoux M, Chochillon C, Matheron J, Datry A et al. Comparison of antifungal MICs for yeasts obtained using the EUCAST method in a reference laboratory and the Etest in nine different hospital laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 863–869.
 25. Cuenca-Estrella M. et al. Multicentre determination of quality control strains and quality control ranges for antifungal susceptibility testing of yeasts and filamentous fungi using the methods of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol infect* 2007; 13:1018-1022.
 26. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline, 2nd ed., M44-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 27. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Zone diameter interpretative standards, corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretative breakpoints, and quality control limits for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; informational supplement, 3rd ed. CLSI document M44-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA.
 28. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Reference method for antifungal disk diffusion testing of non-dermatophyte filamentous fungi; approved guideline. CLSI document M51-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA.
 29. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for antifungal disk diffusion testing of non-dermatophyte filamentous fungi: informational supplement. CLSI document M51-S1. Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA.
 30. Arendrup M, Lundgren B, Jensen IM, Hansen BS, Frimodt-Moller N. Comparison of Etest and a tablet diffusion test with the NCCLS broth microdilution method for fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Candida* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 521–526.
 31. Arendrup MC, Garcia-Effron G, Lass-Flörl C, Lopez AG, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Perlin DS. 2010. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and isosensitest media. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:426–439.
 32. N. Kiraz, I. Dag, Y. Oz, M. Yamac, A. Kiremitci, N. Kasifoglu, Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of caspofungin, voriconazole, amphotericin B, itraconazole and fluconazole against *Candida glabrata*, *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 82, 2, 136
 33. Sandven P. Detection of fluconazole-resistant *Candida* strains by a disc diffusion screening test *J. Clin. Microbiol.*, 37 (1999), pp. 3856–3859
 34. Arendrup MC, Park S, Brown S, Pfaller M, Perlin DS. Evaluation of CLSI M44-A2 disk diffusion and associated breakpoint testing of caspofungin and micafungin using a well-characterized panel of wild-type and FKS hot spot mutant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* May 2011; 55(5): 1891–1895.

35. Astvad KM, Perlin DS, Johansen HK, Jensen RH, Arendrup MC. Evaluation of caspofungin susceptibility testing by the new Vitek 2 AST-YS06 yeast card using a unique collection of FKS wild-type and hot spot mutant isolates, Including the five most common *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 177–182.
36. Arendrup MC, Pfaller MA. Danish Fungaemia Study Group. Caspofungin Etest susceptibility testing of *Candida* species: risk of misclassification of susceptible isolates of *C. glabrata* and *C. krusei* when adopting the revised CLSI caspofungin breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:3965–3968.
37. Axner-Elings M, Botero-Kleiven S, Jensen RH, Arendrup MC. 2011. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* isolates collected during a 1-year period in Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 49:2516–2521
38. Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in vitro. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010;8:267-76.
39. Perlin DS. Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22: 568–573.
40. Cuenca-Estrella M. Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi: from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jun;20 Suppl 6:54-9.
41. EUCAST technical note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:982-984.
42. Lass-Flörl C. Susceptibility testing in *Aspergillus* species complex. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20 (Suppl. 6): 49–53
43. 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: 4545–4549.
44. Howard SJ, Arendrup MC. Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection *Med Mycol* (2011) 49 (Supplement 1): S90-S95
45. Astvad KMT, Jensen RH., Hassan TM, Mathiasen EG. et al. First Detection of TR46/Y121F/T289A and TR34/L98H Alterations in *Aspergillus fumigatus* Isolates from Azole-Naive Patients in Denmark despite Negative Findings in the Environment. *Antimicrob. Agents Chemother*. September 2014 58:9 5096-5101
46. Pham CD, Reiss E, Hagen F, Meis JR, Lockhart SR. Passive surveillance for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*, United States, 2011–2013. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2014 Sep [date cited]
47. 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.
48. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M et al. ESCMID/ECMM Joint clinical guideline for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20 (Suppl. 3): 76–98
49. Arendrup M.C, Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida* *Clin Microbiol Infect* 2014; 20 (Suppl. 6): 42–48
50. Vale-Silva LA, Pinto P, Lopes V, Ramos H, Pinto E. Comparison of the Etest and a rapid flow cytometry-based method with the reference CLSI broth microdilution protocol M27-A3 for the echinocandin susceptibility testing of *Candida* spp. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:941–946.
51. Vella A, De Carolis E, Vaccaro L, Posteraro P, Perlin DS, Kostrzewa M, Posteraro B, Sanguinetti M. Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis. *J Clin Microbiol*. 2013;51:2964–2969.
52. Furustrand Taffin U, Clauss M, Hauser PM, Bille J, Meis JF, Trampuz A. Isothermal microcalorimetry: a novel method for real-time determination of antifungal susceptibility of *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:E241–E245.

2.10 Serumkonsentrasjonsmålinger av antimykotika

Stein Bergan, Medisinsk biokjemi, seksjon for farmakoterapi, OUS-Rikshospitalet
Farmakologisk monitorering (Therapeutic Drug Monitoring; TDM) av soppmidler er begrunnet i variabel farmakokinetikk, relativt smalt terapeutisk område og muligheten for individualisert dosering som både kan øke effekt og redusere forekomsten av bivirkninger.

Analyse av azolene vorikonazol, itraconazol (inkl hydroksoy-itraconazol) og posakonazol er etablert som rutinetilbud ved Avdeling for farmakologi, Rikshospitalet, Oslo universitetssykehus. Det anbefales at man tar såkalt medikamentfastende prøve ("C0"), og analysen gjøres i serum.

Anbefalte terapeutiske konsentrasjonsområder er omtrentlige og har foreløpig ikke tilstrekkelig støtte i prospektive studier. Underbehandling har vært ansett som et problem, og det er anbefalt at man for vorikonazol og itraconazol oppnår C0-verdier over 1 mg/L, i visse situasjoner over 2 mg/L. Tilsvarende forslag for posakonazol ligger omkring 0,7 til 1,25 mg/L. Når det gjelder toksisitet, har man ikke kunnet påvise sterk assosiasjon mellom konsentrasjon og bivirkninger, men i et par studier er det vist henholdsvis økt nevrotoksitet (vorikonazol over 5,5 mg/L) og utslag i leverprøver ved høyere vorikonazol-konsentrasjoner.

Farmakokinetisk variabilitet er betydelig, både innen og mellom individer. Forskjellene i dosebehov for å nå terapeutiske serumkonsentrasjoner mellom individer kan bl.a. skyldes sekvensvarianter i gener som koder for metaboliserende enzymer. Azolene metaboliseres primært av cytokrom P450 (CYP)2C19-enzymet. Her forekommer genvarianten *CYP2C19*17* som gir økt enzymaktivitet og dermed redusert konsentrasjon, og andre sekvensvarianter som gir manglende (*2, *3, og *4) eller redusert (*10) enzymaktivitet og dermed økt konsentrasjon. I en kaukasisk befolkning vil omtrent 60 % bære minst en genvariant som kan påvirke CYP2C19-enzymaktiviteten. Flere studier har vist sammenheng mellom *CYP2C19*-genotype og azol-konsentrasjon og -toksisitet. Andre legemiddel-metaboliserende enzymer er også involvert i ulik grad ved metaboliseringen av ulike soppmidler. For denne legemiddelgruppen kan det være aktuelt å utføre CYP-genotyping, enten på forhånd for mer tilpasset startdose eller under behandling for eventuelt å forklare høye eller lave konsentrasjoner. Dette er foreløpig ikke i rutinemessig bruk for azolene. Siden azolene både er substrater for CYP-enzymet og står for betydelig hemming av enzymaktiviteten, er de både utsatt for og årsak til legemiddelinteraksjoner. Spesielt har det vært vist flerfoldig reduksjon av dosebehov for immunsuppressiva som takrolimus og everolimus under behandling med vorikonazol.

For andre soppmidler som micafungin, caspofungin og flucytosin har analyse vært etterspurt, men er så langt ikke etablert ved noe laboratorium her i landet.

Kontaktpersoner for analyse av soppmidler: Nils Tore Vetthe og Stein Bergan.

2.10.1 Oppsummering og anbefaling etter møtet med henvisning til nylig publiserte Britiske retningslinjer for monitorering av soppmidler:

Det var ingen kontroverser på strategikonferansen, men det presiseres at det er viktig at fagmiljøet har kjennskap til betydningen av serumkonsentrasjonsmålinger ved behandling med nyere azoler.

Valg av medikament og dosering ved optimal behandling av soppinfeksjoner må ta høyde for blant annet infeksjonssteds agens, medikamentinteraksjoner og komorbiditet som lever og nyresvikt (1). Biotilgjengelighet vil være avhengig av bla administrasjonsform, opptak, eliminering og infeksjonssted (2). Noen av soppmidlene doseres etter vekt og alder med korreksjon for nyrefunksjon, eller dialyse og eventuelt leverfunksjon. Amfotericin B (alle formuleringer), flukonazol, terbinafin, caspofungin, micafungin og anidulafungin krever ikke terapeutiske konsentrasjonsmålinger for optimal dosering. Biotilgjengelighet for triazolene er mer variabel med stor variasjon i farmakokinetikken, variabel absorpsjon, metabolisering og utskillelse. Dette kan føre til insuffisient behandling eller toksisitet. Alle triazolene er substrat for en eller flere av enzymene i cytokrom P-450 systemet. Aktiviteten i disse enzymene er delvis genetisk betinget. Kjennskap til genetisk disposisjon og interaksjoner kan lette dosering, og det finnes oversikter over utallige genvarianter og legemiddelinteraksjoner med forutsigbar effekt på forventet serumkonsentrasjon (3). Det er også etablert praksis å bruke konsentrasjonsmålinger for å tilpasse doseringen av azolene med unntak av flukonazol og for flucytosin individuelt (4-7). Britiske retningslinjer for monitorering av soppmidler er nylig publisert(9). For *Aspergillus sp* forutsetter dessuten følsomhetskategoriseringen at man har oppnådd terapeutiske serumkonsentrasjoner (10,11). Serumkonsentrasjonsmåling av Flucytosin anbefales da midlet har et smalt terapeutisk område (9,12). I litteraturen opererer man med noe ulike terapeutiske områder avhengig av målemetode som benyttes. På OUS-Rikshospitalet er det etablert tilbud om serumkonsentrasjonsmålinger av azoler ved hjelp av massespektrometri (LC-MSxMS)

Vorikonazol:

Terapeutisk område: Vorikonazol 1–5 mg/L (tentativt)

Det er stor variasjon i oppnådd serumkonsentrasjon blant annet avhengig av alder, genetisk predisposisjon (bla polymorfisme i Cyp2C19A gen) og interaksjoner med andre medikamenter. Uten konsentrasjonsmålinger må en anta at en betydelig andel av pasientene er underdosert, men man kan også se overdosering med økt risiko for bivirkninger som synsforstyrrelser, leverpåvirkning og nevropsykiatriske symptomer, noe som øker med serumkonsentrasjoner over 5-6 mg/L. Overgang fra intravenøs til peroral behandling er kritisk, likeså interaksjoner med medikamenter som påvirker cytokrom P-450 og forandring i klinisk tilstand. Serumkonsentrasjonsmåling anbefales ila første 5 dager, deretter regelmessig og terapeutisk konsentrasjon >1 mg/L eller MIC ratio bør 2-5 tilstrebes. For infeksjoner med dårlig prognose bør konsentrasjoner > 2 mg/L tilstrebes.

Posakonazol

Anbefalt terapeutisk område: 0,7 mg/L (tentativt ved profylakse) >1mg/L (terapeutisk)

Studier viser stor variasjon i oppnådd plasmakonsentrasjon, sannsynlig med bakgrunn i ulik absorpsjon fra tarm. Det er ikke rapportert om doseavhengige bivirkninger.

Serumkonsentrasjonsmåling anbefales etter 7 dagers behandling, ved usikker absorpsjon, eks diare, ved spørsmål om interaksjoner eller usikker compliance, og i forbindelse med doseendringer. Noen oppgir anbefalt serumkonsentrasjon 0,38 mg/L 48 timer etter oppstart ved profylakse.

Itrakonazol

Anbefalt terapeutisk område: 0,5 (profylakse) >0,5- ca 4 mg/L (terapeutisk)

Svært variabel farmakokinetikk og mange interaksjoner. Konsentrasjonsmålinger er anbefalt, men terapeutisk område er avhengig av målemetode pga bioaktive metabolitter. Angis å være 0,5-4.0 mg/L ved HPLC og massespektrometri. Gjennombruddsinfeksjoner er rapportert ved

lave serumkonsentrasjoner og økt fare for bivirkninger ved høye konsentrasjoner. Det anbefales kontroll av serumkonsentrasjon ila første behandlingsuke og deretter jevnlig.

Prøvetaking og forsendelse ved serumkonsentrasjonsmåling av azoler: se hjemmesiden www.anx.no

Prøvemateriale: Serum (glass uten tilsetning, send inn serum),

Volum: minst 0,5 ml serum (sentrifugert)

Prøvetakingstidspunkt: som regel umiddelbart før dose (C0)

Oppbevaring: 3 døgn i romtemp. 1 uke i kjøleskap, Lengre tid: i fryser.

Forsendelse:

Prøven bør sendes samme dag. Ordinær post og romtemperatur.

Hvis prøven skal oppbevares bør den fryses fram til forsendelse, men kan da sendes i romtemperatur.

Prøven sendes til:

Oslo Universitetssykehus HF-Rikshospitalet

Prøvemottak - Avd. for medisinsk biokjemi

Postboks 4950 Nydalen

0424 Oslo

Flucytosin

Flucytosin brukes lite i Norge, hovedsakelig ved candidaendokarditt og kryptokokkinfeksjoner. Midlet skal ikke brukes som monoterapi og fås kun på registreringsfritak. Monitorering anbefales, hovedsakelig for å unngå toksiske konsentrasjoner og bivirkninger som benmargssuppresjon og leverpåvirkning, men utføres ikke i Norge. Konsentrasjonsmåling bør foretas i første uken etter oppstart hos alle pasienter, innen 72 timer hos nyfødte og ved nyresvikt.

Undersøkelsen utføres med bioassay ved Mycology Reference Centre, Manchester

<http://www.mycologymanchester.org/antifungal.php>

Terapeutisk område Flucytosin (Mycology Reference Centre, Manchester):

Voksne:	Pre-dose	30-40 mg/L
	Post-dose	70-80 mg/L
Nyfødte: (<3 måneder)	Pre-dose	20-40 mg/L
	Post-dose	50-80 mg/L
Verdier >100mg/L er potensielt toksiske.		

Lenker til oversikt over interaksjoner:

<http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?nac/interactions/patientchoosegeneric.php~main>

<http://www.pharmacologyweekly.com/>

Referanser:

1. Andes D, Optimizing antifungal choice and administration. *Current Medical Research and Opinion* 2013;29:S4, 13-18
2. Lewis RE; Current Concepts in Antifungal Pharmacology. *Mayo Clin Proc.* 2011;86(8):805-817
3. Ashbee HR, Gilleece MH. Has the era of individualised medicine arrived for antifungals? A review of antifungal pharmacogenomics. *Bone Marrow Transplantation* (2012) 47, 881–894
4. Andes D, Pascual A, Marchetti O. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:24-34.
5. Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis* 2008;46:201-11.
6. Neely M, Rushing T, Kovacs A, Jelliffe R, Hoffman J. Voriconazole pharmacokinetics and pharmacodynamics in children. *Clin Infect Dis* 2010 Jan 1;50(1):27-36.
7. Howard SJ, Lestner JM, Sharp A, Gregson L, Goodwin J, Slater J, Majithiya JB, Warn PA, Hope WW. 2011. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of posaconazole for invasive pulmonary aspergillosis: clinical implications for antifungal therapy. *J. Infect. Dis.* 203:1324–1332.
8. Ashbee HR, Barnes RA, Johnson EM, Richardson MD, Gorton R, Hope WW, Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology *J Antimicrob Chemother.* 2014 May; 69(5): 1162–1176
9. 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.
10. Hope WW, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, et al. EUCAST technical note on voriconazole and *Aspergillus* spp. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E278-80.
11. <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases/therapeutic-drug-monitoring/>

2.11 Mikrobiologisk diagnostikk ved gjærsoppinfeksjoner

Cecilie Torp Andersen, Mikrobiologisk avdeling, OUS Rikshospitalet

Innledning:

Gjærsopp er betegnelsen på en vekstform for ikke beslektede sopp innen Ascomycota og Basidiomycota og består av runde, ovale eller elongerte celler eller blastokonidier som deler seg ved knopp skyting fra overflaten og danner nye enkeltceller eller kjeder av gjærceller. Celleveggen inneholder kitin, mannan og andre polysakkarider. Mange av gjærsoppene har både kjønnet og en ukjønnet formering, og har forskjellig navn avhengig av om de forkommer i den ene eller andre formeringsformen. 200 ulike anamorfe stadier av *Candida* sp fordeler seg på minst 10 ulike telemorf (seksuelle former) genera *Clavispora*, *Debarymyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces* og *Pichia* som også tilhører Saccharomycetales ordenen. *Cryptococcus* spp, *Malassezia* spp, *Trichosporon* spp og *Rhodotorula* spp tilhører ulike ordener i gruppen av Basidiomycota

Identifisering baserer seg tradisjonelt på en kombinasjon av biokjemiske og morfologiske egenskaper. Med unntak av *Malassezia* vokser gjærsopp godt på rutinemidler for bakterier og sopp, vanligvis innen 1-3 døgn.

Molekylær mikrobiologi har ført til en reorganisering av sopp. Nomenklaturen endres og det arbeides internasjonalt med å organisere så en art bare skal ha et navn for å forhindre forvirring.

Infeksjoner med gjærsopp

Candidainfeksjoner sees hos ulike grupper med immunsvekkede pasienter inklusiv pasienter på intensivheter. Immunsupprimerende behandling, steroider, nøyтроpeni, andominalkirurgi, bredspektret antibiotika, nyresvikt, CVK og TPN er noen av riskofaktorene.¹ Risiko for soppinfeksjoner vedvarer etter organtransplantasjon, selv om insidensen er høyest i tidlig fase etter transplantasjon.² Gastrointestinaltraktus er den vanligste inngangsporten ved disseminert *Candida*-infeksjon. Sjeldnere sees primær kateerrelatert

infeksjon, men intravasale kateter vil i annen omgang kunne koloniseres ved hematogen spredning av *Candida*.

C. albicans utgjør ca 70 % av de invasive candidainfeksjoner i Norge^{1,3}, etterfulgt av *C. glabrata*, *C. parapsilosis* og *C. tropicalis*. Også andre sjeldnere *Candida* species sees regelmessig, mens infeksjon med *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Geotrichum* og *Trichosporon* species sjeldent forekommer i Norge. Internasjonalt rapporteres en endring i speciesdistribusjon ved candidemi og med unntak av kryptokokker rapporteres det om økende forekomst også av disse sjeldnere artene.⁴

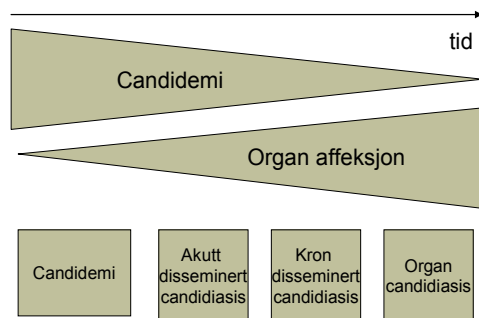
Invasive Candidainfeksjoner:

A. Hematogent disseminerte infeksjoner

- Candidemi
- Akutt disseminert *Candida*-infeksjon med eller uten candidemi
- Kronisk disseminert *Candida*-infeksjon (tidligere også kalt hepatosplenisk candidiasis)

B. lokalisert infeksjon

- Organmanifestasjon i bløtdeler, bukhule, CNS, indre øye, nyrer/urinveier, skjelett, pleura, lunger (sjelden).



Invasive invasive infeksjoner med annen gjærsopp

A: Fungemi:(opp til 5 % av alle invasive gjærsoppinfeksjoner)

- *Saccharomyces cerevisiae*
 - nøytropene/immunsupprimerte/kritisk syke- enteral translokasjon/CVK
- *Rhodotorula* spp
 - nøytropene/immunsupprimerte CVK relatert sjelden: lokalisert sykdom
- *Malassezia furfur* species kompleks
 - Premature/immunsupprimerte ofte relatert til lipidholdig TPN
 - Vokser ikke på rutinemedier- trenger lipid!
- *Trichosporon* spp
 - *T.asahii*, *T.mucoides*, *T.inkin* og *T.louberi* kan gi systemisk infeksjon hos immunsupprimerte.

B: Kryptokokkose: *C. neoformans*, og *C. gattii* (Meningitt og/eller disseminert sykdom)

- AIDS
- Immunsuppresjon

Overfladiske infeksjoner candida og andre gjærsopp

A: Hud

- Kutan candidainfeksjon
 - Intertrigo
 - bleiedermititt
 - *Candida*-infeksjon i mamillen (amming/trøske)
 - Kronisk mucokutan candidiasis

- Pityriasis versicolor (*Malassezia furfur*)
- *Malassezia*-follikulit
- B: Neglinfeksjon
- Paronyki
- Kronisk *Candida*-onykomykose
- C: Slimhinner
- Oral candidose
 - trøske
 - glossitt
 - stomatitt
 - angulær cheilit (perlèche)
- Vulvo-vaginal candidose
- Balanitt
- Øsofagitt

2.11.1 Mikrobiologisk diagnostikk ved gjærsoppinfeksjoner:

Egnet prøvemateriale avhenger av risikogruppe og sykdomsmanifestasjon. Ved overfladiske candidainfeksjoner er dyrkning ikke nødvendigvis indisert, men anbefales ved behandlingssvikt under pågående behandling. Mikroskopi/histologi er viktig ved vevsbiopsier (se innlegg) og nok blod ved blodkulturprøvetaking. (se innlegg) Dyrkning og blodkultur kan være negativ og bruk av surrogatmarkører øker internasjonalt.

ESCMID har utarbeidet anbefalinger for håndtering av *Candida* infeksjoner i ulike pasientgrupper som ikke nøytrone voksne⁵, barn og nyfødte⁶, hos hematologiske pasienter⁷ og ved HIV/AIDS⁸ med anbefalinger om kriterier for bruk av profylakse, valg av behandlingsstrategi, dessuten en egen anbefaling for diagnostikk av ulike typer av candidainfeksjoner⁹. Påvisning av Mannan/anti-mannan og 1,3-β-D-glukan er fortsatt ikke tilgjengelig i Norge.

Påvisning av gjærsopp direkte i prøvemateriale lykkes noen ganger ved 18sPCR eller ITS PCR og sekvensering, men spesifikk PCR tilbys fortsatt ikke i Norge. Patologene kan påvise *C. albicans* ved immunhistokjemi om hyfer påvises ved histologi, noen steder anvendes også in situ hybridisering på snitt og mucinfarging for påvisning av kapsel i vev ved mistanke om kryptokokkinfeksjon. Kryptokokkantigen i spinalvæske og serum samt direkte mikroskopi av spinalvæske med tusj eller calcofluor white anbefales ved mistanke om kryptokokkinfeksjon.^{10,11} Septifast og andre PCR metoder for påvisning av sopp direkte i blod har så langt ikke slått an, mens rask identifikasjon av agens i positiv blodkulturflaske ved hjelp av PNA-FISH, DNAmicroarray, og MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) massespektrometri er svært lovende. Implementering av ny metodikk i mykologien har tatt tid, og in-house PCR tester med manglende standardisering er fortsatt vanlig. Pga manglende data er ikke metodene vurdert/gradert i europeiske retningslinjer, så langt.⁹

Av mangel på bedre surrogatmarkører er massiv kolonisering gjerne innarbeidet i en ”koloniseringsindeks” eller ”candidascore” som anvendes som en indikasjon på mulig invasiv sykdom hos en risikopasient. Funn ved kolonisering er til hjelp for valg av adekvat empirisk behandling i risikogruppene.^{6,10} Forsinket adekvat behandling over 12 timer øker dødeligheten ved invasiv candidainfeksjon signifikant.¹² Bruk av surrogatmarkører vil i fremtiden forhåpentligvis kunne bedre diagnostikken ved invasive infeksjoner.

Fig bearbeidet fra ⁹ Cuenca-Estrella et al Clin Microbiol Infect 2012;18(Suppl 7) 9-18:

Sykdomsbilde	Prøvetype	Tester	ESCMID anbefaling	Grad
Candidemi	Blod	Blodkultur	Essensielt	NA
	Serum	Mannan/anti-mannan B-D-glucan Andre: Antistoff Septifast Andre PCR tester	Anbefalt Anbefalt Ingen Ingen Ingen	II II Ingen data Ingen data Ingen data
Invasive candidiasis	Blod	Blodkultur	Essensielt	NA
	Serum	Mannan/anti-mannan B-D-glucan	Ingen Anbefalt	Ingen data II
	Vev og sterile væsker	Direkte mikroskopi og histopatologi	Essensielt	NA
		Dyrkning	Essensielt	NA
		Immunhistokjemi Direkte PCR In situ hybridisering	Ingen Ingen Ingen	Ingen data Ingen data Ingen data
Kronisk disseminert candidiasis	Blod	Blodkultur	Essensielt	NA
	Serum	Mannan/anti-mannan B-D-glucan Septifast Andre PCR tester	Ingen Anbefalt Ingen Ingen	Ingen data II Ingen data Ingen data
	Vev og sterile væsker	Direkte mikroskopi og histopatologi	Essensielt	NA
		Dyrkning	Essensielt	NA
		Immunhistokjemi Direkte PCR In situ hybridisering	Ingen Ingen Ingen	Ingen data Ingen data Ingen data
Orofaryngeal og øsofagal candidiasis	Penselprøve	Dyrkning	Essensielt	NA
	Biopsi (ikke påkrevet)	Direkte mikroskopi og histopatologi Dyrkning Direkte PCR	Essensielt Essensielt Ingen	NA NA Ingen data
Vaginal candidiasis	Pensel/vaginal-sekret	Direkte mikroskopi Dyrkning Kommersielle tester In house PCR	Essensielt Essensielt Bruk validerte tester Ingen	NA NA NA Ingen data

2.11.2 Identifikasjon av gjærsopp i laboratoriet:

Som i mykologien forøvrig baseres identifikasjonen av gjærsopp tradisjonelt på morfologi, vekstbetingelser og biokjemiske reaksjoner som assimilasjon og fermentasjon av sukker, assimilasjon av nitrat og ureaseproduksjon. Kommersielle identifikasjonsmetoder benytter seg av disse egenskapene og av påvisning av enzymaktivitet, delvis i kombinasjon med morfologi. Nye sekvensbaserte metoder erobrer også mykologien (se eget innlegg om MaldiTOF og molekylære metoder), de er tidsbesparende og utfordrer tidligere tradisjonell inndeling og nomenklatur. MaldiTOF MS teknologi er i tillegg svært rask og rimelig og har kommet for å bli.

Krav til speciesidentifikasjon:

Avhengig av prøvemateriale og pasientkategori kreves ulikt presisjonsnivå for speciesidentifikasjon og behov for resistensbestemmelse av isolatet. Isolat fra blod og sterilt område skal alltid identifiseres til speciesnivå og resistensbestemmes.

Rask identifikasjon av invasive isolat er avgjørende for riktig behandling da ulike species har forutsigbar resistensprofil.(fig 2)

Fig 2 Naturlig (primær) resistens hos gjærsopp ovenfor midler til systemisk bruk:
bearbeidet fra ¹⁰ Bone Marrow Transplantation (2012) 47, 1030–1045

Mikrobe	AMB	Echinocandin	Flukonazol	Posakonazol	Vorikonazol	Itrakonazol	Flucytosin
<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. glabrata</i>	S	S	I/R	S/I/R*	S/I/R*	S/I/R*	S
<i>C. parapsilosis</i>	S	I	S	S	S	S	S
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. krusei</i>	S	S	I/R	S/I/R*	S/I/R*	I/R	R
<i>C. dubliniensis</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. norvegiensis</i>	S	S	R	S	S/I	S/R	R
<i>Cryptococcus neoformans</i>	S	R	S**		S	I	S
<i>Trichosporon</i> sp	S/I/R	R	I/R	S	S	I/R	R
<i>Rhodotorula</i> sp	S	R	R	R	R	R	S

* også villtypen uten ervervet resistens er mindre følsom for azoler **heteroresistens er beskrevet

Gjærsopp er en del av vår normalflora og oppvekst fra ikke sterile områder vil være vanskelig å tolke og er ikke ensbetydende med infeksjon. Under pågående antibiotikabehandling vil i tillegg normalflora påvirkes og gjærsopp kan dominere helt, uten at infeksjon foreligger. På laboratoriet må man derfor forsøke å skille mellom normalflora, kolonisering og infeksjon avhengig av prøvemateriale og pasientkategori. Ved bruk av sopp-profylakse vil normalfloraen kunne påvirkes og man må ta høyde for å kunne påvise sopp resistent for det aktuelle middel.

Hos hematologiske pasienter og andre høyrisikopasienter på nyfødtintensiv, intensiv og postoperativ skal gjærsopp ALLTID identifiseres til species nivå da senere infeksjon kan oppstå fra koloniserende flora. ^{5,10}

Candida isolert fra mer enn 3 lokalisasjoner tyder på massiv kolonisering og øker sannsynligheten for infeksjon, men behandlingsindikasjon må vurderes **sammen med** kliniske parametere.

2.11.3 Krav til identifikasjon av gjærsopp i ulike prøvematerialer:

Oppvekst fra antatt sterilt område:	Krav til identifikasjon til species- nivå	Resistens- bestemmelse	Referanse- undersøkelse	Spesielle vekstforhold	Spesielle forhold/ vurdering
Blod	JA	JA	JA	Vurder utsæd mtp. <i>Malazessia</i> sp hos premature Obs dimorf sopp og kryptokokk	<i>Candida</i> sp isolert fra blodkultur tatt perifert <i>eller</i> fra CVK definerer candidemi og skal <i>alltid</i> behandles ^{1,5-9,13} CVK bør om mulig fjernes ved candidemi ¹³ Daglige blodkulturer for vurdering av behandling- lengde ⁵
Spinalvæske	JA	JA	anbefales		tusj-mikroskopi mtp kapsel urease og CRAG
Aspirat Biopsi Vev	JA	JA	anbefales	Ved hepato-splenisk candida kun 20–30 % positive biopsier	PCR, sekvensering insitu- hybridisering Immunhistokjemi bør tilstrebes

Oppvekst fra antatt sterilt område:	Krav til identifikasjon til species- nivå	Resistensbestemmelse	Referanseundersøkelse	Spesielle vekstforhold	Spesielle forhold/ vurdering
Peritoneal-dialysevæske	JA	Ved non-albicans Ved pågående behandling og behandlingssvikt	Evt ved non-albicans		ALLTID SIGNIFIKANT
Ascites Puss intra-abdominalet	JA	Ved non-albicans Ved pågående behandling og behandlingssvikt	Ikke rutine	Obs kolonisering av inneliggende dren	Gjærsopp er en del av normal tarmflora og påvises ofte intraabdominalt i forbindelse med perforasjoner og etter kirurgiske inngrep i tarm, galleveier, pankreas ¹⁴ og ved organtransplantasjoner

Materiale:	Krav til identifikasjon	Resistensbestemmelse	Referanseundersøkelse	Kolonisering vs infeksjon	Vurdering
CVK-spiss	Ved signifikant oppvekst: Som blod	Ved signifikant oppvekst: Som blod	Ikke rutine	Forurensning med hudflora eller infeksjon	CVK fjernes ved mistanke om infeksjon. Spissen bør sendes til dyrkning sammen med perifer blodkultur Maki's roll teknikk med semikvantitativ utsæd anbefales, men ingen har studert verdien av metoden for candidemier. ¹⁰
Luftveier/BAL	Species-identifikasjon kun som ledd i overvåkning av risikopasienter	Vurderes ved pågående behandling og ved behandlingssvikt	Ikke rutine	Candida abscesser/invasiv sykdom i lunger kan foreligge som ledd i disseminert sykdom, eller ved direkte invasjon av lungevev, men funn i BAL, sputum og trakealsekret korrelerer ikke med disse tilstandene. Det kreves en biopsi for å påvise invasivitet, likeså anastomoseinfeksjon med candidainfeksjon	Candida er en del av normalflora i øvre luftveier og sees hyppig som forurensning fra øvre luftveier. ⁵ Fravær av Candida i BAL har høy negativ prediktiv verdi. ^{5,15} OBS kryptokokk og dimorf sopp

Materiale:	Krav til identifikasjon	Resistensbestemmelse	Referanseundersøkelse	Kolonisering vs infeksjon	Vurdering
Urin	Candida albicans eller non-albicans Der hvor behandling er indisert identifikasjon til species nivå	Ved pågående behandling og ved behandlingssvikt	Ikke rutine	Candiuri bør behandles hos:nyretransplanterte, pasienter som skal gjennomgå kirurgiske inngrep i urinveiene, premature, nøythropene og hos inneliggende pasienter med symptomer. ^{9,10}	Signifikant candiduri: $\geq 1 \times 10^3$ CFU/mL (?) man bør bekrefte funnet i ny prøve (spontan eller kateter) OBS kryptokokk og dimorf sopp alltid signifikant
øsofagus	Species identifikasjon ved kompliserte infeksjoner og hos pasienter på behandling	Resistensbestemmelse anbefales ved gjentatte eller kompliserte infeksjoner og ved forutgående azolbehandling ^{5,9,10}	Ikke rutine	Det kreves en biopsi for å påvise invasivitet, men hos risikopasienter regnes endoskopisk tatt prøve med oppvekst som godt nok for diagnose ^{9,10}	Normal-flora
Vaginalsekret*	Species identifikasjon anbefales ved gjentatte eller kompliserte infeksjoner og ved forutgående azolbehandling ⁹	resistenstesting anbefales ved gjentatte eller kompliserte infeksjoner og ved forutgående azolbehandling ⁹	Ikke rutine		Dyrkning på selektiv agar ⁹

*Utdrag fra strategirapporten 2010 s 14:

Diagnostikk

Ved ukomplisert CVV:

- Klinisk undersøkelse, pH måling fra materiale tatt fra vaginalveggen (ikke i fluor). Som oftest vil pH være normal; <4,5.
- Mikroskopi etter sopphyfer og gjærceller av KOH- våtpreparat
- Dyrkning dersom mikroskopi er negativ
Besvares med vekst av gjærsopp med mengdeangivelse (artsidentifikasjon ikke nødvendig)

Ved komplisert CVV:

- Dyrkning. Uavhengig av resultat fra våtpreparat
Besvares med artsidentifikasjon, mengdeangivelse og eventuelt resistensbestemmelse for midler som kan være aktuelle i behandlingen.

Dyrkning

- Selektive soppmedier inkuberes ved 28-30 grader i minimum 2 dager.
- Kromogene medier kan benyttes til primærutsæd. Inkuberes i henhold til skålprodusentens anvisning.
- Inkubasjonstid forlenges ved kliniske opplysninger om antimykotisk terapi.

2.11.4 Metoder for identifikasjon av gjærsopp:

I tillegg til kimrør som er spesifikk for *C. albicans* og *C. dubliniensis*, finnes mange kommersielle tester for rask identifikasjon av andre vanlige Candida species inklusiv lateks agglutinasjonstester og hurtig trehalose test som ilar minutter tillater identifikasjon av *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* og *C. glabrata*.

Maldi-TOF utkonkurrerer disse testene ved å gi speciesidentifikasjon både av ulike Candida spp, men også andre gjærsopp¹⁶⁻¹⁸ i løpet av kort tid til en rimelig pris, men krever investering i utstyr og tilgang til rett bibliotek/soppdatabase.

Tradisjonelle hurtigtester:

- Kimrør *positiv*: *Candida albicans* eller *C. dubliniensis*
- Tusjpreparat – påvise kapsel (mukoide isolat - *Cr. neoformans*)

Kommersielle hurtigtester:

- Bichro-Latex albicans (Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret Cedex, Frankrike)
 - Til gruppeidentifisering av *Candida albicans* og *Candida dubliniensis*.
 - Testen kan erstatte kimrør på enkeltkolonier. Positiv agglutinasjon tyder på at stammen er *C. albicans* **eller** *C. dubliniensis*. Tidsforbruk: 5 min ¹⁸
- Bichro-Dubli (Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret Cedex, Frankrike)
 - Latexpartikler med monoklonale antistoff mot *C. dubliniensis* ytterantigen.
- Krusei-Color (Fumouze Diagnostics)
 - Latexpartikler med monoklonale antistoff mot *C. krusei* ytterantigen.
- Glabrata R.T.T. (Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret Cedex, Frankrike)
 - påviser trehalose ²⁰

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight massespektrometri identifikasjon (MALDI TOF MS): (Se eget innlegg)

- Tillater species identifikasjon og skiller mellom nært beslektede species til en rimelig kostnad i løpet av kort tid.
- svært god hjelp til identifikasjon av gjærsopp i rutinen, både direkte på positiv blodkulturflaske og fra kultur.
- Noen species må ombenevnes før besvarelse..., se nomenklatur

- Minst 9 norske mikrobiologiske laboratorier har MALDI TOF MS

Genteknologisk identifikasjon (Se eget innlegg)

In situ hybridisering på blodkulturflaske/kultur/vev

- PNA FISH (AdvanDx, Vedbaæk, Danmark) ²¹

ITS PCR og sekvensering direkte på biopsier eller for identifikasjon av isolat

Nomenklatur:

Ved bruk av MALDI TOF MS teknologi og sekvensering får man noen ”overraskelser” om man ikke er oppdatert innen nomenklatur. Det arbeides internasjonalt med begrepet ”one fungus-one name”.

Noen eksempler på species som kan skape forvirring:

anamorf :

C. krusei

C. sorbosa

C. robusta

C. famata.

C. guilliermondii

C. kefyri

Cr. neoformans

teleomorf:

Issatchenkia orientalis

Issatchenkia occidentalis

Saccharomyces cerevisiae

Debaromyces hansenii

Pichia guilliermondii
var. *guilliermondii*

Kluyveromyces marxianus

Filobasidiella neoformans

Identifikasjon av vekst av gjærsopp på skål:

Morfologisk undersøkelse basert på mikroskopi og karakteristika på ulike vekstmedier

Kromogene medier

Kromogene medier inneholder spesifikke kromogene substrat som ved degradering ved hjelp av spesifikke enzymer hos de ulike candidaarter gir ulike fargede produkt ved vekst på skålen.

Disse mediene kan benyttes som primærmedium og til subkultivering av kolonier. De hyppigst forekommende *Candida* spp har karakteristisk farge og kolonimorfologi og i tillegg til preliminær identifikasjon vil mediene bedre avsløre blandingsinfeksjon. Fargeomslag krever minst 48 timers inkubasjon for entydig identifikasjon og skålene bør inkuberes i 3 døgn for å avdekke blandingskulturer. Ulike nyanser av rosa kan gjøre det vanskelig å skille for eksempel *C.glabrata* og *C.parapsilosis*.^{22,23}

CMT Cornmeal tween-skål

fremmer dannelse av hyfer, pseudohyfer, klamydiokonidier, artrokonidier og blastokonidier til hjelp ved artsbestemmelse.

PAL skål

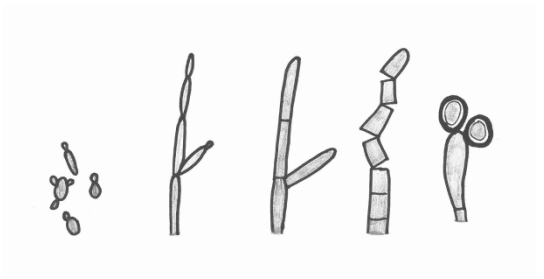
Fremmer produksjonen av hyfer, pseudohyfer og klamydkonidier hos *Candida dubliniensis* og gjør det mulig å skille *C. dubliniensis* fra *Candida albicans* morfologisk.

Noen typiske karakteristika hos ulike gjærsopp til hjelp ved artsbestemmelse:

	blastokonidier	pseudohyfer	hyfer	askosporer	artrokonidier	diverse
<i>C.albicans</i>	+	+	+			Kimrør+
non-albicans	+	v	v			Klamydiosporer
<i>Saccharomyces</i>	+	v	v	+		
<i>Cryptococcus</i>	+					Kapsel+
<i>Rhodotorula</i>	+					rosa/rød/gul evt kapsel
<i>Geotrichium</i>	+		+		+	
<i>Tricosporon</i>	+	+	+		+	Ofte tørre

Hjelp til preliminær artsbestemmelse:

	Kromagar 2-3 dager	CMT	forgjæring	diverse
<i>C.albicans</i>	Grønn (*ikke tørr)	Hyfer, pseudohyfer blastokonidier, evt chlamydiokonidier	++-+-	Kimrør + (skiller ikke m. <i>C.dubliniensis</i>) ”stjerner”
<i>C.glabrata</i>	Lilla		+----	Trealose hurtigst+
<i>C.krusei</i>	Lilla og tørr		+----	Konfluerende vekst ved 42 °
<i>C.tropicalis</i>	Blålilla, diffunderer i agar		++++-	
<i>C.parapsilosis</i>	Lys rosa		++---	
<i>S.cervisiae</i>	Små, lilla pigment diffunderer i agar	Store ofte avlange blastokonidier, pseudohyfer	++++-	ascosporer
<i>Cr.neoformans</i>	Bleke kremfarget/rosa	Blastokonidier	---- assimilasjon	Kapsel, Urease+
<i>Rhodotorula</i>	gul-rosa-rød.	Blastokonidier		Kan ha kapsel, Urease+
<i>Trichosporon</i>	*Grønn til blå	Hyfer, pseudohyfer, blastokonidier og arthrokonidier		Kan være tørr, (Urease + Falsk positiv kryptokokk Ag)



Forgjæring:

Glukose/galaktose/sakkarose/maltose/laktose (noe variasjon kan forekomme)

a) b) c) d) e)

- a) Blastokonidier- dannet ved knoppkytting
- b) Pseudohyfer - elongerte celler som fortsatt henger sammen.
- c) Ekte hyfer - har markerte septa.
- d) Arthrokonidier - fragmentert hyfer som danner kjeder av individuelle celler.
- e) Klamydosporer - oppstår i enden av en pseudohyfe. Store, sfæriske, sterkt refraktile celler.

Kommersielle identifikasjonssystemer

Kommersielle identifikasjonssystemer baserer seg på ulike biokjemiske reaksjoner og påvisning av ulike enzymer fra kultur, til dels med samtidig bruk av morfologiske egenskaper eller ulike vekstegenskaper hos agens for sikrere speciesidentifikasjon.²⁴⁻²⁶ Vitec benytter colometrisk måling.²⁷ Ulike systemer opererer med ulik inkubasjonstid før endelig svar, opptil 42 timer. Ved utførelse av sekundærarbeid benyttes først og fremst sabouraudskålen, men noen av identifikasjonsmetoder er mindre agaravhengige.²⁴ Obs feilidentifikasjoner forekommer.

- **Vitec2 ID-YST** (bioMérieux, Mercy l'Etoile, France)
- **Phoenix Yeast ID** (BD)
- **API 20C AUX** (bioMérieux, Mercy l'Etoile, France)
- **API Candida** (bioMérieux, Mercy l'Etoile, France)
- **Rapid ID 32 C** (bioMérieux, Mercy l'Etoile, France)
- **RapidIDYeastPlus** (bioMérieux, Mercy l'Etoile, France)
- **MicroScan** (Baxter, W. Sacramento, California.)
- **Auxacolor** (Sanofi Diagnostics Pasteur)
- **Fungichrom** (International Microbio)

Identifikasjon av *Cryptococcus neoformans*:

Kort om sykdom:

Kryptokokkinfeksjon er vanligst hos HIV/AIDS pasienter, men sees også hos pasienter med underliggende sykdom som leukemi, transplanterte, sarkoidose, lupus erythematosus og Cushings syndrom). I sjeldne tilfeller kan det gi sykdom hos friske mennesker. Meningitt er det vanligste sykdomsbildet, men disseminerende infeksjoner med utgangspunkt i lungene forekommer også. Lungeinfeksjonen er ofte subklinisk. Soppen har predilleksjon til CNS men kan isoleres fra hud, skjelett og viscerale organer. Kryptokokkinfeksjon ble bare delvis omtalt i strategirapporten bakterielle infeksjoner i CNS fra 2008.

Agens: *Cryptococcus neoformans* (95 %), sjeldnere *Cr.gatti* (5%) især i tropisk/ subtropiske områder.²⁷⁻²⁸

Diagnostikk.

Meningitt kan foreligge med normalt celletall og lite utslag på spinalsukker og protein. Antigentest i spinalvæske ved meningitt og serum ved kryptokokkose er avgjørende for diagnosen. Det finnes en enkel hurtigtest (dip-stic) og mikroskopi av spinalvæske med tusj eller calcofluor white er også en essensiell undersøkelse ved klinisk mistanke og bør alltid utføres.

Dyrkning av spinalvæske, blod, ekspektorat/BAL, urin kan kreve lang inkubasjonstid og selektive medier anbefales fra ikke sterile områder. (Birdseed evt kromagar)

I vev kan kapsel påvises ved mucinfarging, denne farger mukopolysakkaridet i kapselen, men er ikke spesifikk for kryptokokker.

Kryptokokkantigentest med titerbestemmelse for vurdering av behandlingseffekt anbefales.

Identifikasjon i laboratoriet:

Alle kryptokokker produserer urease og er nonfermentere. På Cornmeal tween 80 produseres kun blastokonidier. For å påvise kapsel bør soppen dyrkes på rike medier (brunskål) for bedre å fremme kapselproduksjon. Koloniene vil da være typisk mukoide. På kromagar vil koloniene være kremfarget/rosa, på birdseed agar brune.

Differensiering av de ulike artene gjøres med hjelp av MaldiTOF, vår erfaring er at helt unge kolonier på fattige medier gir best score. VITEK og andre kommersielle identifikasjonssystemer kan sammen med av vekst ved 37°C gi presumptiv identifikasjon, men kan bla ha problemer med å skille *Cryptococcus neoformans* fra *Cryptococcus gattii*. På Kanavanin-glycin-bromtymol skål vokser bare *Cr.gattii* med fargeomslag fra grønt til blått på agaren. 18 s/ITS PCR og sekvensering fra kultur eller direkte på prøvemateriale kan også benyttes. Påvisning av Kryptokokkantigen på kultur skiller ikke mellom ulike species.

Gjærsopp og Ringtester 2012-13- hva gjorde vi:

1) *C. glabrata* i blodkultur.

Forhåpentligvis benytter alle laboratoriene en selektiv agar for sopp ved utsæd av positiv blodkultur, men dette fremkommer ikke i rapporten. 16 av 24 laboratorier benytter krom-agar til identifikasjon av gjærsopp, men det fremkommer ikke hvor mange av disse som benytter kromagar til primærutsæd, og hvor lenge denne skålen inkuberes mtp blandingskulturer med ulike candidaarter. Identifikasjonen av agens var oppløftene, alle unntatt et laboratorium kom frem til *C. glabrata* og et laboratorium svarte «Candida sp., ikke-albicans». Tid til identifikasjon kommer ikke frem og hvilke råd som gis om behandling og hvor raskt kan heller ikke vurderes i rapporten. Råd om gjentatte blodkulturer og eventuell fjerning av CVK er heller ikke belyst.

2) *C. albicans* fra peroperativ prøve fra abdomen

C. albicans. 75 % av laboratoriene benytter Sabouraud agar, knapt 50 % benyttet krom-agar ved utsæd. Kun et laboratorium påviste ikke gjærsopp i prøven og alle identifiserte stammen korrekt. 11 laboratorier utførte resistensbestemmelse; de fleste (n=9) brukte Etest.

Alle har funnet at stammen var svært følsom overfor alle grupper antimykotika. Bare 4 laboratorier som gir behandlingsråd.

3) *C. albicans* fra vaginalprøve

Alle benyttet selektiv skål (n=18) og/eller kromagar (n=17), og alle med unntak av ett laboratorium fant *C. albicans* (en feilvurdering av kimrør), men få anga mengde. 14 utførte resistensbestemmelse mot flukonazol, dessuten vorikonazol (n=8), anidulafungin (n=5), caspofungin (n=2), amfotericin B (n=1), ekonazole (n=1), nystatin (n=1), klotrimazol (n=1), ketokonazol (n=1). Rapporten kommenterer dette å være helt unødvendig og *dessuten*

villedende. Retningslinjene for antibiotikabruk i primær-helsetjenesten gir behandlingsanbefaling med Imidazol vagitorier eller flukonazol po.

Pasienten kategoriseres som komplisert infeksjon, men det forelå ingen opplysninger om tidligere behandling. Kommentar “Erfaringsmessig flukonazol følsom” kunne være tilstrekkelig i Norge når det ikke foreligger opplysninger om tidligere azolbehandling eller behandlingssvikt, men forfatterne av rapporten anbefaler at resistensbestemmelse utføres mot flukonazol selv om flukonazolresistens hos *C. albicans* er uvanlig, i tråd med europeiske retningslinjer⁹.

Resultat fra ringtestene:

	Mikro- skopi	Kim- rør	Vitek	Krom- agar	Fumouze glabrata	ID 32C	API Candida	Maldi- TOF	Micro Scan	Behandlings anbefaling	Resistens- bestemmelse
1) <i>C. glabrata</i> Isolert fra blod	7	6	9	16	1	1	2	8	1	11	14 2 av disse angir fluconazol S (MIC hhv 4 og 24) Antar at alle ville sendt til ref.lab
2) <i>C. albicans</i> intraabdominalt		5	5	14		1		5	1	4	11 hvorav 9 med E-test 3 sendt til ref. lab
3) <i>C. albicans</i> Isolert fra vaginalsekret		5	7	18	1		1	2		3	14 7 sender til ref.lab

2.11.5 Anbefaling

Ved mistanke om invasiv gjærsoppinfeksjon er det viktig å sikre materiale til dyrkning, Biopsier bør undersøkes histologisk, mikroskoperes og dyrkes på selektive skåler i tillegg til vanlig bakteriologisk undersøkelse.

Invasivt materiale bør dyrkes i *minst* 14 dager⁹, lenger ved positiv mikroskopi eller mistanke om kryptokokker.

Bruk av genteknologiske teknikker bør tilstrebes ved negativ dyrkning fra sterile områder, især ved positiv mikroskopi/histologi.

Riktig blodvolum er essensielt ved blodkulturtaking og blodkultur bør inkuberes i 5-7 dager.

Ved oppvekst av sopp i blodkultur bør utsæd utføres direkte på kromskåler som bør inkuberes i 3 døgn mtp blandingskultur.³⁰

Candida spp isolert fra blodkultur tatt perifert *eller* fra CVK definerer candidemi og skal *alltid* behandles.^{1,5-9}

Surrogatmarkører kan benyttes, men tilbys pt ikke i Norge.

Invasive isolat skal identifiseres til artsnivå og resistensbestemmes og isolatene skal sendes til nasjonalt referanselaboratorium. Også isolat ved persisterende og recurrent candidemi ønskes innsendt.

Identifikasjon av agens til artsnivå er ønsket i koloniseringsprøver hos høyrisikopasienter.^{9,10}

Om pasienten er massivt kolonisert og har andre risikofaktorer iht. ”koloniseringsindeks” eller ”candidascore” bør eventuell empirisk behandling dekke det aktuelle agens.

Ved øsofagitt er identifikasjon av agens til artsnivå og resistensbestemmelse indisert ved opplysninger om kronisk eller komplisert infeksjon eller pågående azolbehandling.

Ved kompliserte og residiverende vaginitter og ved forutgående azolbehandling utføres species identifikasjon og resistenbestemmelse mot flukonazol som er det eneste anbefalte perorale middel ved tilstanden.

Alle laboratorier må:

- Identifisere og skille mellom *C.albicans* og andre *Candida spp*
- Påvise *Cr. neoformans* (spinalvæske, blod, BAL, urin, hudlesjoner)

Alle laboratorier bør:

- Gjenkjenne vanligst forekommende isolat med kjent resistensprofil som får betydning for behandlingsvalg.
 - Flukonazol: *C. glabrata* (I eller R) og *C. krusei* (R)
 - Helst kunne utelukke *C.parapsillosis* mtp unødig echinocandinbehandling

Alle sykehus med større hematologiske avdelinger bør:

- ha mulighet for artsidentifikasjon ila 2 døgn
 - MALDI-TOF løser oppgaven raskere og svært godt og er nå tilgjengelig på minst 9 laboratorier i Norge. Obs Riktig bibliotek er viktig (se egen sesjon)

2.11.6 Konklusjon

På møtet fremkom ingen kontroverser vedrørende anbefalingene oppsummert over. Norske laboratorier gjorde det godt i ringtestene forut for strategimøtet. Ny teknologi blir stadig mer utbredt og ”revolusjonerer” identifikasjon i mykologien, MalditoF gjør dette raskt og effektivt. Man poengterte betydning av koloniserende flora hos immunosupprimerte. *Candida spp* i normalflora hos andre pasienter skal sjelden tillegges vekt, med noen unntak; eks ved mistanke om øsofagitt, dessuten mulig betydning av gjentatte funn i urin hos utvalgte pasienter (urologiske pasienter, nøydropene og pasienter på nyfødtintensiv). Dette er ikke beskrevet i strategirapporten for urinveisinfeksjoner. Problemstillingen med residiverende vaginitter og vulvitter ble ikke inngående diskutert da dette ble tatt opp på strategimøte i 2010 (se *Strategirapport 2010*, side 14). Dyrkning og identifikasjon til artsnivå er bare nødvendig ved kompliserte infeksjoner og som hovedregel er det også da nok med resistensbestemmelse mot flukonazol.

Det var bred enighet om fortsatt innsending av invasive isolat til referanselaboratoriet, nå også ved persisterende infeksjon.

Referanser:

1. Nasjonal faglig retningslinje for antibiotikabruk i sykehus: Invasive soppinfeksjoner <http://helsedirektoratet.no/sites/antibiotikabruk-i-sykehus/terapikapitler/invasive-soppinfeksjoner/Sider/default.aspx>
2. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR et al Invasive Fungal Infections among Organ Transplant Recipients: Results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Clin Infect Dis. (2010) 50 (8): 1101-1111.
3. NORM rapport 2012
4. Miceli, MH, Díaz, JA, Lee SA, Emerging opportunistic yeast infections Lancet Infect Dis 2011;11:142-51
5. Cornely OA, Bassetti M, Calandr T et al , ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients, Clinical Microbiology and Infection, 2012, 18 (Suppl.7) 19-37

6. Hope WW et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: Prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by Candida spp. *Clinical Microbiology and Infection* 2012;18 (Suppl. 7) 38-52
7. Ullmann AJ et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012 Adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT) *Clin Microbiol Infect* 2012; 18 (Suppl. 7) 53-67
8. Lortholary O et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: Patients with HIV infection or AIDS *Clin Microbiol Infect* 2012; 18 (Suppl. 7) 68-77
9. Cuenca-Estrella M et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012. Diagnostic procedures. *Clinical Microbiology and Infection* 2012;18 (Suppl. 7), 9–18
10. Arendrup MC, Bille J, Dannaoui E, et al ECIL-3 classical diagnostic procedures for the diagnosis of invasive fungal diseases in patients with leukaemia Bone Marrow Transplantation (2012) 47, 1030–1045
11. Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect Dis* 2003; 3:230–40.
12. Morrell M, Fraser VJ, et al. Delaying the empiric treatment of Candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:3640–5.
13. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin infect dis* 2009;48:503-35
14. Solomkin JS, Mazuski JE, Bradley JS et al Diagnosis and management of Complicated Intra-Abdominal Infection in Adults and Children: Guidelines by the surgical Infection Society and Infectious Diseases Society of America. *Surgical Infections* 11:3, 79-109
15. Kontoyiannis DP, Reddy BT, Torres HA, Luna M, Lewis RE, Tarrand J et al. Pulmonary candidiasis in patients with cancer: an autopsy study. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 400–403.
16. Kolecka A et al Identification of medically Relevant Species of Arthroconidial Yeasts by Use of Matrix-Assisted laser desorption Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry. *J.Clin.Microbiol.* 2013 51(8):2491
17. Marklein G, Josten M, Klanke U, Muller E, Horre R, Maier T et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2912–2917.
18. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3482–3486.
19. Chryssanthou E, Fernandez V, Petrini B. Performance of commercial latex agglutination tests for the differentiation of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* in routine diagnostics. *APMIS* 2007; 115: 1281–1284
20. Freydiere AM, Perry JD, Faure O, Willinger B, Tortorano AM, Nicholson A et al. Routine use of a commercial test, GLABRATA RTT, for rapid identification of *Candida glabrata* in six laboratories. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4870–4872.
21. Shepard JR, Addison RM, Alexander BD, Della-Latta P, Gherna M, Haase G et al. Multicenter evaluation of the *Candida albicans/Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 50–55.
22. Ghelardi E et al Efficacy of chromogenic Candida agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008; 14:141–147.
23. Hospenthal DR, et al 2006. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar Candida. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5:1.
24. Valenza G, et al Evaluation of new colorimetric Vitek 2 yeast identification card by use of different source media. *J. Clin. Microbiol.* 46:3784–3787.

25. Sanguinetti, M Evaluation of VITEK 2 and RapID Yeast Plus Systems for Yeast Species Identification: Experience at a Large Clinical Microbiology Laboratory *Journal of clinical microbiology*:2007 Volum:45 hefte:4 side:1343 -1346
26. Graf B., Adam T., Zill E., Gobel U.B. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms (2000) *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (5), 1782-1785.
27. Hata DJ, Hall L, Fothergill AW, Larone DH, Wengenack NL. Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric identification card. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1087–92.
28. Hazen KC, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In: Murray PR, editor. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press 2007;1762–88.
29. Cendejas-Bueno E, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Identification of pathogenic rare yeast species in clinical samples: comparison between phenotypical and molecular methods. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1895–1899.
30. Arendrup MC, Chryssanthou E, Gaustad P, Koskela M, Sandven P, Fernandez V. Diagnostics of fungal infections in the Nordic countries: we still need to improve! *Scand J Infect Dis* 2007;39:337-343.

2.12 Mikrobiologisk diagnostikk ved muggsoppinfeksjoner

Peter Gaustad, Mikrobiologisk avdeling, OUS Rikshospitalet

2.12.1 Kort oversikt over vanligste agens

Snakker ikke om dimorfe sopp og dermatofytter som også er filamentøse sopper.

Hva er sopp?

Er fylogenetisk et eget kongedømme: Fungi

Sopp kan ha asexuell og seksuell formering. De seksuelle (teleomorfe) og de aseksuelle formene (fungi imperfecti) har forskjellige navn (*Pseudoscheria boydii*/*Scedosporium apiospermum*), noe som kan virke forvirrende.

Eukaryote organismer. Bryter ned organisk materiale med syre og hydrolytiske enzymer før de tar opp næringsstoffene. Kan leve på dødt (kompost *Aspergillus*) eller levende materiale (ringorm, fotsopp).

Muggsopp er filamentøse (hyfer, mycelium) i motsetning til gjærsopp som er enkeltceller (blastosporer). Muggsopp formerer seg ved sporer – disse kan lett være luftbårne. Viktigste smittereservoar er luftbårne sporer, men kan også se smitte fra mat, vann, vanntanker i sykehus, kompost, annet nedbrutt organisk materiale og ventilasjon.

Smittemåte er viktig for riktig prøvetaking. Ved invasiv sykdom er inhalasjon viktigste smittemåte og luftveier hyppigst affisert (lunger, bihuler). Men ser også primære infeksjoner i for eksempel GIT, hud, kornea og etter traumer. Sekundært kan filamentøse sopp spre seg med blodbanene fra primær fokus og gi infeksjoner i andre organer. *Aspergillus* kan ikke dyrkes fra blod, men det kan flere andre filamentøse sopper (*Fusarium*, *Acremonium*, *Scedosporium*).

Hyppigste ikke invasive infeksjon er i ytre øregang.

A. fumigatus forårsaker de fleste muggsoppinfeksjonene i Norge, men ser også non-*fumigatus* arter (*A. flavus*, *A. terreus*). *A. niger* er ofte forurensning ved dype infeksjoner, men er hyppigste årsak ved ekstern otitt og sees hyppig ved aspergillom.

Andre viktige slekter/ arter er *Mucorales*/*Entomophthorales* (gir *Zygomycosis*, *mucormycosis*), *Fusarium*, *Acremonium*, *Pseudoscheria boydii*/*Scedosporium apiospermum*.

En vanlig inndeling av muggsoppinfeksjoner er etter mikroskopisk bilde ved histopatologi. Et lignende bilde vil ses ved mikroskopering i det mikrobiologiske laboratoriet, men svart pigmenteringen av hyfer er vanskelig å se uten spesialfarging.

- **Aspergillus:** hyaline hyfer med septa. Hyfene har parallelle vegger og deler seg i to dichotomously i en vinkel <45 grader.
- **Zygomycetes:** brede, tynnveggede, hyaline hyfer med få eller ingen septa. Hyfeveggene er ikke parallelle, irregulære og vridde.
- **Phaeohyphomycosis (dematiaceous, sort pigmenterte hyfer):** sopp i familien Dematiaceae (*Curvularia*, *Bipolaris*, *Exserohilum*, *Alternaria*). Heterogen gruppe av muggsopp som ved mikroskopi av infisert vev opptrer med fargeløse, forgrenede hyfer med septa som kan være vanskelig å skille fra *Aspergillus*.
- **Hyalohyphomycosis (non-dematiaceous, hyaline, "ikke" pigmenterte hyfer)** er muggsopp infeksjoner med ikke-pigmenterte sopp andre enn slektene *Aspergillus* og *Zygomycetes*. Vanligst er arter innen slektene *Scedosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Trichoderma* eller *Pseudallescheria*. De er karakterisert av et svakt brunt til svart melaninlignede pigment i hyfeveggen.

2.12.2 Vanligste sykdomsbilder

Aspergillus arter er de vanligste årsakene til muggsoppinfeksjoner i Norge hos immunsvekkede pasienter, men infeksjoner forårsaket av tidligere meget sjeldne hyaline og sort pigmenterte filamentøse sopper øker i hyppighet.

Invasiv – ikke invasiv infeksjon. Invasiv soppinfeksjon er til stede når det:

- I histo- eller cytopatologisk undersøkelse fra tynn-nålsaspirasjon eller biopsi påvises hyfer i vev med vevsskade (mikroskopisk eller ved billeddiagnostikk)
- Påvises vekst av sopp fra prøve tatt ved steril prosedyre fra normalt sterilt område med unntak av urin og slimhinner.

Mennesker inhalerer flere hundre sporer daglig. Disse håndteres av granulocytter/fagocytter og gir kun sykdom hos immunsvekkede. Obs nøytropeni.

Aspergillusinfeksjoner.

Sykdomsspekter:

Kolonisering - Invasiv aspergillose – Kronisk aspergillose - Allergisk aspergillose:

Diagnostisk er det viktig med prøver fra sterile områder. Økende fokus på kolonisering og sensibilisering hos ABPA og alvorlig astma. Diagnostisk nytte av serologi ved kroniske og allergiske lidelser.

Zygomycosisinfeksjoner.

Sykdomsspekter: rhinocerebral, pulmonær, gastrointestinal, kutan (etter traume), disseminert. Dyrkning fra sterile områder. Ingen serologi.

Fusarium infeksjoner.

Sykdomsspekter; kutane/subkutan (hyppigste presentasjon), disseminerte (nest hyppigste), pulmonær (3. hyppigst), rhinocerebral, keratitt, osteomyelitt, gastrointestinal. Dyrkning fra sterile områder. Ingen serologi.

2.12.3 Når mistenke muggsoppinfeksjon

Klinisk mistanke: Sykdom hos immunsvekkede med grav nøytropeni.

Predisponerende faktorer: nøytropeni, transplantasjon (obs benmarg), GVHD, CMV infeksjon, steroidbehandling, HIV, IDA, CGD.

Mikrobiologisk mistanke: Funn av muggsopp i prøve fra immunosupprimert pasient skal alltid rapporteres. Kliniker må vurdere om funnet er reelt ved å samholde med eventuell klinikk og radiologiske funn, eventuell mikroskopi/histologi og eventuelt ta nye prøver. (Unntak *Penicillium* sp)

Vanskelig å skille kolonisering fra infeksjon i luftveier. Funn av muggsopp bør identifiseres og rapporteres hos pasienter på respirator, ved ABPA, aspergillom, astma, CF og hos pasienter på steroider

Vekst i blodkultur: kun sopp som sporulerer i vev (*Fusarium*, *Acremonium*). Oppvekst av *Aspergillus* og *Zygomycetes* i blodkultur kan forekomme hos terminale pasienter, men er vanligvis forurensning.

2.12.4 Krav til identifikasjon ved primær laboratorium

Ved invasiv sykdom viktig med identifikasjon helst til artsnivå, siden det gir opplysninger om behandlingsvalg

i. I ulike prøvematerialer

Fra sterile områder og hos immunosupprimert: identifisere til arts nivå

Fra ikke sterile områder og overflate infeksjon: tilstrekkelig med identifikasjon til slekts nivå.

Ved gjentatte funn av samme art muggsopp ved ABPA, KOLS og CF kan funnet ha klinisk betydning og identifikasjon og resistensbestemmelse er indisert.

Hvis et funn oppfattes som forurensning kan det besvares uten nærmere identifikasjon som muggsopp.

ii. Metoder

Konvensjonelle metoder:

Makroskopisk morfologi. Koloni utseende (form, farge, størrelse) bakside og forside.

Mikroskopisk morfologi (bomullsblått, bruk av stereomikroskop). Hyfer med og uten septa, deling, parallelle/ikke parallelle hyfevegger. Utseende og størrelse av makrokonidier, makrokonidier,

Dyrkningsbetingelser: vekst ved forskjellige temperaturer, vekst på spesial medier

”Hurtigid” av *A. fumigatus*: grønn på Sabouraud, vekst ved 45⁰ C, typiske hoder ved mikroskopi.

«Nye» metoder:

Maldi-Tof og nukleinsyre påvisning se egne kapitler

2.12.5 Bruk av Referanselaboratoriet

Alle muggsopp isolater fra sterile områder hvor disse tillegges diagnostisk verdi skal sendes til referanselaboratoriet. Funn fra ikke sterile områder innsendes også fra pasienter med alvorlig immunosuppresjon når funnet tillegges diagnostisk verdi eller ved andre tilstander som CF eller ABPA hvor antimykotisk behandling igangsettes.

Viktig å sende inn isolater for at vi skal få nasjonal oversikt over muggsoppinfeksjoner.

Hva bør ikke sendes til id

Fra overflatiske infeksjoner (ekstern otitt, hud, hår, negl, ???)

Koloniseringsprøver når behandling ikke er indisert. Evt fryse ned lokalt.

Når utføres resistensbestemmelse

Resistensbestemmelse av isolater fra sterile områder og hos pasienter hvor soppbehandling er indisert. Det er kun noen *Aspergillus* sp. hvor det er etablert brytningspunkter. Men MIC bestemmelse pluss identifikasjon gir god behandlingsveiledning.

Konklusjon

Viktig å vurdere pasient og kliniske opplysninger før funnet rapporteres som muggsopp og forurensning.

Forbehandling av prøvematerialet med middel før utsæd viktig for optimalt dyrkningsresultat.

Dyrkningsbetingelser: bruke to temperaturer, selektive soppskåler og forlenget inkubasjonstid for å øke det diagnostiske utbyttet.

Samholde molekyler diagnostikk med morfologi og mikroskopi

Primærlaboratoriet: bør identifisere muggsopp fra sterile områder og fra immunsupprimerte pasienter til artsnivå ved hjelp makroskopisk utseende, mikroskopi og vekst ved forskjellige temperaturer.

Isolatene sendes til Referanselaboratorium for verifisering av identifikasjon og resistensbestemmelse.

Anbefalt litteratur:

www.mycology.adelaide.edu.au

<http://www.doctorfungus.org/>

<http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases>

<http://www.aspergillus.org.uk>

Bennett JE. Aspergillus species. In: Mandell G, Douglas RG, Bennett JE, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. New York, USA: J Wiley.

Cuenca-Estrella M et al. Detection and investigation of invasive mould disease. J. Antimicrob Chemother 2011;66 Suppl 1:i15-24.

Liu JC, DE. Modha, EA Gaillard, What is the clinical significance of filamentous fungi positive sputum cultures in patients with cystic fibrosis?, Journal of Cystic Fibrosis 2013; 12/3: 187-193

Murray PR, ed. Manual of Clinical Microbiology. 10th edn. Washington DC: American Society for microbiology.

Nucci M, Anaissie E. Emerging fungi. Infect Dis Clin North Am 2006;20:563-579

Vyzantiadis TA, EM Johnson, CC Kibbler. From the patient to the clinical mycology laboratory: how can we optimise microscopy and culture methods for mould identification? J Clin Pathol 2012;65:475-483

Willinger B, Obradovic A, Selitsch B, et al. Detection and identification of fungi from fungus balls of the maxillary sinus by molecular techniques. J Clin Microbiol 2003;41:581-585

2.13 Diagnostikk ved pneumocystis jirovecii infeksjoner

Fredrik Muller, Mikrobiologisk avdeling, OUS Rikshospitalet

Kort om agens

P. jirovecii er en soppart innen phylum *Ascomycota* der menneske er eneste vert. *P. jirovecii* forårsaker alvorlig pneumoni hos pasienter med svekket T-celleimmunitet. Beslektede *Pneumocystis*-arter har andre pattedyr som vert, f. eks. *Pneumocystis carinii* hos rotte og *Pneumocystis murina* hos mus. Mye taler for at menneske er eneste reservoar for *P. jirovecii*, selv om forekomst av denne sopparten i naturen ikke kan utelukkes (1). *P. jirovecii* har intet kjent dyreresservoar. Andre *Pneumocystis*-arter smitter ikke til menneske (2).

De fleste smittes av *P. jirovecii* før 2-4 års alder (3-6), sannsynligvis som subklinisk infeksjon eller som en banal luftveisinfeksjon. Enkelte autopsifunn fra lunge tyder på at *P. jirovecii* er

vanlig i befolkningen (7), mens andre studier av immunkompetente individer ikke har påvist tilstedeværelse av *P. jirovecii* DNA (8). Pneumocystis-pneumoni hos immunsupprimerte skyldes sannsynligvis luftsmitte fra koloniserte personer eller andre pasienter med Pneumocystis-pneumoni (9;10). En rekke utbrudd av Pneumocystis-pneumoni i sykehus blant immunsupprimerte er beskrevet (11).

P. jirovecii genomet er nylig sekvensert (12). Bl. a. mangler en rekke gener som koder for aminosyresyntese og *P. jirovecii* må derfor tilegne seg aminosyrer fra verten. Celleveggen er rik på (1→3)-β-D-glukan, men mangler ergosterol. Det viktigste overflateprotein er ”major surface glycoprotein” (MSG). Over tid viser MSG antigen variasjon, noe som bidrar til at soppunngår vertens immunrespons. *P. jirovecii* har hittil ikke latt seg dyrke i laboratoriet. Soppens livssyklus er ikke endelig avklart, men basert på studier av *P. carinii* er det beskrevet en tynnvegget, ”trofisk” form som binder seg til type 1 alveolær epitel. Denne formen kan via tidlige, intermediære og sene sporocytter utvikle seg til en cyste. Cysten er opphav til sporer som igjen binder seg til epitelcellene som den ”trofiske” formen (13;14).

Alveolærmakrofager og CD4⁺ T-lymfocytter er sentrale i immunresponsen mot *P. jirovecii* (10). Ved pneumocystis-pneumoni øker antall granulocytter og CD8⁺ T-lymfocytter i alveolene (10). Disse cellene fører til økt lokal inflammasjon og vevsskade som igjen fører til nedsatt gassutveksling og forverring av tilstanden. Med andre ord er immunologiske mekanismer viktige i patogenesen ved pneumocystis-pneumoni (10;15).

Etter de første beskrivelsene av Pneumocystis for litt over 100 år siden, gikk det nesten 40 år før Pneumocystis-pneumoni ble beskrevet hos premature og underernærte barn (9). Fra starten av HIV-epidemien ble pneumocystis-pneumoni erkjent som en viktig opportunistisk infeksjon (16;17). Etter innføringen av moderne HIV-behandling i vår del av verden har antall tilfelle med pneumocystis-pneumoni hos HIV-seropositive falt betydelig (18;19). Andre viktige pasientgrupper som er utsatt for pneumocystis-pneumoni er organ- og stamcelletransplanterte pasienter, pasienter med malign sykdom (særlig maligne blodsykdommer) og pasienter som får immunosuppressiv behandling (20;21). Forekomsten av pneumocystis-pneumoni i disse pasientgruppene synes å øke (19) og sykdommen har også et mer akutt forløp med kraftigere inflammasjon og høyere letalitet (9;20;22). I nedre luftveisprøver er det også færre cyster til stede enn hos HIV-seropositive med pneumocystis-pneumoni (23).

2.13.1 Aktuelle undersøkelser og egnet prøvemateriale

Aktuelle metoder for påvisning av *P. jirovecii* i luftveisprøver omfatter (i) kjemiske fargemetoder som viser soppelamentenes (spesielt cystenes) morfologi ved mikroskopi, (ii) immunmorfologiske fargemetoder med merkede antistoffer som er spesifikke for *P. jirovecii* antigener, gjerne i form av immunfluorescensmikroskopi, (iii) påvisning av *P. jirovecii* DNA ved PCR (eller liknende teknikker). I tillegg kan måling av β-glukan i serum være en aktuell tilleggsundersøkelse.

Kjemiske fargemetoder

Det er beskrevet en rekke kjemiske fargemetoder, hvorav noen gir farging av cystevegg, bl. a. Gomori's methenamin-sølvfarging, toluidin blått O og Calcofluor white farging. Andre, og mindre spesifikke, metoder farger sporocytter og sporer (”trophozoitte”), bl. a. Giemsa-farging og Wright farging (24). Disse fargemetodene ble anvendt i større utstrekning tidligere, men er nå i stor grad erstattet av immunmorfologiske og DNA-baserte metoder. Kun bronkial skyllevæske, indusert sputum og lungebiopsi anbefales ved bruk av disse

metodene (24). De er mindre sensitive enn immunmorfologiske metoder (9;20).

Immunmorfologiske fargemetoder

Mange monoklonale antistoffer mot *P. jirovecii* er kommersielt tilgjengelige, bl. a. klon 3F6 og 2G2 som gjenkjenner ulike stadier av soppen, inklusive cyster. Andre kloner, som R13/3G4-6 og 5E12, gjenkjenner kun cyster. Antistoffene kan kjøpes konjugert, f. eks. til fluorescein isotiocyanat (FITC) og det er også ferdige ”kits” på markedet. Påvisning av cyster kreves for sikker identifikasjon av *P. jirovecii* (25;26).

Anbefalt prøvemateriale er bronkial skyllevæske. Indusert sputum kan aksepteres, men har lavere sensitivitet (27). Lungebiopsi er akseptabelt. Seigt prøvemateriale bør forbehandles, f. eks. med dithiotreitol (28). Oppkonsentrering ved sentrifugering ($\geq 1000g$ i minst 10 min.) anbefales for prøvemateriale i væskeform. For mikroskopi kan materiale avsettes på objektglass manuelt eller ved hjelp av cytospin sentrifuge. Prøvebehandling er godt beskrevet i (27).

Påvisning av *P. jirovecii* DNA

Det anvendes flere ulike målgener for påvisning av *P. jirovecii* DNA (22). Målgener som mt rLSU (mitochondrial ribosome large sub-unit) og MSG er multikopi-gener og anvendes for å oppnå høyere sensitivitet. Andre målgener som β -tubulin, 5S rDNA, 18S rDNA, DHFR (dihydrofolat reduktase), DHFS (dihydrofolat syntase) og Hsp 70 (heat shock protein 70) anvendes også (22). I følge siste rapport fra QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics) for *P. jirovecii* fra 2012 (29) ble mt rLSU og MSG hyppigst anvendt som målgen, av hhv 39 % og 34 % av deltakerne. Selv om enkelte kommersielle tester er tilgjengelige, brukes stort sett ”in house” metoder. I QCMD-rapporten angis det at 69 av 86 deltakende laboratorier (80 %) anvendte ”in house” metoder (29). Ved bruk av ”real-time” PCR kan *P. jirovecii* DNA-mengden kvantiteres. I den samme QCMD-rapporten var det 10 laboratorier (12 %) som rapporterte kvantitative svar. Siden nevneren i et kvantitativt PCR-resultat fra nedre luftveisprøver er usikker, er det et alternativ å angi DNA-mengden semikvantitativt (30).

Bronkial skyllevæske, indusert sputum og lungebiopsi er anbefalte prøvematerialer for påvisning av *P. jirovecii* DNA, der bronkial skyllevæske sannsynligvis er å foretrekke fremfor indusert sputum. I tillegg har *P. jirovecii* vært påvist i lettere tilgjengelige prøvematerialer som munnskyllvann (31;32).

(1 \rightarrow 3)- β -D-glukan i serum

β -glukan er til stede i celleveggen hos de aller fleste medisinske viktige sopparter og påvisning i serum brukes derfor ved diagnostikk av invasive soppinfeksjoner (33;34). Det er gjort flere studier av nytten av β -glukanmåling i serum ved *P. jirovecii* infeksjon (35;36). Brukt alene har markøren lav positiv prediktiv verdi, mens den negative prediktive verdien er høy (36). Måling av serum β -glukan har i flere studier vært brukt sammen med PCR fra nedre luftveisprøver for å skille *P. jirovecii* kolonisering fra klinisk infeksjon (37;38).

2.13.2 Resistensforhold

Trimetoprim-sulfa og Dapson er viktige midler ved behandling og profylakse ved *P. jirovecii* infeksjon (20). Dyrestudier viser at det overveiende er sulfa-komponenten i trimetoprim-sulfa som har anti-Pneumocystis aktivitet (39). Sulfaresistens hos *P. jirovecii* er assosiert med visse

punktmutasjoner i genet som koder for dihydropteroat syntase (DHPS) og som fører til aminosyresubstitusjoner i posisjon 55 og 57 (40). Siden *P. jirovecii* ikke lar seg dyrke, baserer studiene seg på genotypiske undersøkelser med påvisning av aktuelle resistensmutasjoner. Forekomsten av disse resistensmutasjonene er svært varierende i ulike publikasjoner – i enkelte studier påvises høy forekomst av DHPS-mutasjoner (41-43), mens det i andre studier påvises få eller ingen resistensmutasjoner (44-46). Flere studier har vist sammenheng mellom DHPS-mutasjoner og trimetoprim-sulfa profylakse, men enkelte studier er vanskelig å vurdere (40). Videre er sammenhengen mellom DHPS-mutasjoner og klinisk resistens uklar (40).

2.13.3 Anbefaling

Pneumocystis-diagnostikken er nå i stor grad rettet mot immunsupprimerte pasienter som er HIV-seronegative. Disse pasientene, som har et mer akutt sykdomsforløp og større grad av inflammasjon i lungene, har også færre cyster i nedre luftveisprøver (22;23;47). Dette stiller økte krav til sensitiv diagnostikk, samtidig som man må søke å skille infeksjon fra kolonisering. I svenske anbefalinger for påvisning av *P. jirovecii* ved hematologisk sykdom og etter stamcelletransplantasjon anbefales primært bruk av immunmorfolologisk metode fra bronkialskyllvæske. Ved PCR-undersøkelse vil negativt resultat ha høy prediktiv verdi, høy DNA-konsentrasjon vil tale for infeksjon mens lav DNA-konsentrasjon vil tale for kolonisering (48).

Basert på tilgjengelig litteratur anbefales det å kombinere immunmorfolologisk metode med PCR-diagnostikk, der det gjøres en semikvantitativ eller kvantitativ vurdering av mengden av Pneumocystis-DNA (49). Laboratoriet bør gjøre en samlet vurdering av funnene og kommentere holdepunkt for infeksjon, henholdsvis kolonisering.

Diagnostisk kan en primært utføre immunmorfolologisk metode, og ved negativt funn gjøre (semi)kvantitativ PCR. Alternativt kan det primært settes opp PCR, dernest immunmorfolologisk metode ved positiv PCR (evt positiv PCR over definert grenseverdi ved bruk av (semi)kvantitativ metodikk).

Betydningen av β -glukan i serum som tilleggsundersøkelse ved spørsmål om Pneumocystis-pneumoni er pt uavklart. Det er mulig at denne analysen kan bidra til å skille kolonisering fra infeksjon med *P. jirovecii*. Dette bør studeres nærmere i form av prosjekt, helst med deltakelse fra flere laboratorier.

Mange norske laboratorier utfører immunmorfolologisk fargemetode for påvisning av *P. jirovecii*, enkelte utfører også PCR-diagnostikk. De laboratorier som utfører PCR-diagnostikk bør gjøre en form for kvantitering (semikvantitativ/kvantitativ) for å vurdere hvor mye Pneumocystis-DNA som er til stede i prøven. Det antas at disse laboratoriene også utfører immunmorfolologisk fargemetode og dermed kan sammenholde resultater fra de to undersøkelsene.

De laboratorier som kun anvender immunmorfolologisk fargemetode bør ved negative funn og klinisk mistanke om Pneumocystis-pneumoni videresende prøver til PCR-diagnostikk. Det må da gjøres en samlet vurdering av resultat av de to undersøkelsene.

Referanser:

1. Morris,A., and Norris,K.A. 2012. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**:297-317.
2. Aliouat-Denis,C.M., Chabe,M., Demanche,C., Aliouat,e.M., Viscogliosi,E., Guillot,J., Delhaes,L., and Dei-Cas,E. 2008. *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. *Infect. Genet. Evol.* **8**:708-726.
3. Pifer,L.L., Hughes,W.T., Stagno,S., and Woods,D. 1978. *Pneumocystis carinii* infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. *Pediatrics* **61**:35-41.
4. Vargas,S.L., Hughes,W.T., Santolaya,M.E., Ulloa,A.V., Ponce,C.A., Cabrera,C.E., Cumsille,F., and Gigliotti,F. 2001. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin. Infect. Dis.* **32**:855-861.
5. Meuwissen,J.H., Tauber,I., Leeuwenberg,A.D., Beckers,P.J., and Sieben,M. 1977. Parasitologic and serologic observations of infection with *Pneumocystis* in humans. *J. Infect. Dis.* **136**:43-49.
6. Beard,C.B., Fox,M.R., Lawrence,G.G., Guarner,J., Hanzlick,R.L., Huang,L., Rio,C.D., Rimland,D., Duchin,J.S., and Colley,D.G. 2005. Genetic differences in *Pneumocystis* isolates recovered from immunocompetent infants and from adults with AIDS: Epidemiological Implications. *J. Infect. Dis.* **192**:1815-1818.
7. Ponce,C.A., Gallo,M., Bustamante,R., and Vargas,S.L. 2010. *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clin. Infect. Dis.* **50**:347-353.
8. Wilson,J.W., Limper,A.H., Grys,T.E., Karre,T., Wengenack,N.L., and Binnicker,M.J. 2011. *Pneumocystis jirovecii* testing by real-time polymerase chain reaction and direct examination among immunocompetent and immunosuppressed patient groups and correlation to disease specificity. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **69**:145-152.
9. Kovacs,J.A., and Masur,H. 2009. Evolving health effects of *Pneumocystis*: one hundred years of progress in diagnosis and treatment. *JAMA* **301**:2578-2585.
10. Thomas,C.F., Jr., and Limper,A.H. 2007. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis pneumonia*. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:298-308.
11. de Boer,M.G., de Fijter,J.W., and Kroon,F.P. 2011. Outbreaks and clustering of *Pneumocystis pneumonia* in kidney transplant recipients: a systematic review. *Med. Mycol.* **49**:673-680.
12. Cisse,O.H., Pagni,M., and Hauser,P.M. 2012. De novo assembly of the *Pneumocystis jirovecii* genome from a single bronchoalveolar lavage fluid specimen from a patient. *MBio.* **4**:e00428-12.
13. Chabe,M., Aliouat-Denis,C.M., Delhaes,L., Aliouat,e.M., Viscogliosi,E., and Dei-Cas,E. 2011. *Pneumocystis*: from a doubtful unique entity to a group of highly diversified fungal species. *FEMS Yeast Res.* **11**:2-17.
14. Martinez,A., Aliouat,e.M., Standaert-Vitse,A., Werkmeister,E., Pottier,M., Pincon,C., Dei-Cas,E., and Aliouat-Denis,C.M. 2011. Ploidy of cell-sorted trophic and cystic forms of *Pneumocystis carinii*. *PLoS. One.* **6**:e20935.
15. Gigliotti,F., and Wright,T.W. 2005. Immunopathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Expert. Rev. Mol. Med.* **7**:1-16.
16. Masur,H., Michelis,M.A., Greene,J.B., Onorato,I., Stouwe,R.A., Holzman,R.S., Wormser,G., Brettman,L., Lange,M., Murray,H.W. et al 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N. Engl. J. Med.* **305**:1431-1438.
17. Gottlieb,M.S., Schroff,R., Schanker,H.M., Weisman,J.D., Fan,P.T., Wolf,R.A., and Saxon,A. 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **305**:1425-1431.
18. Kaplan,J.E., Hanson,D., Dworkin,M.S., Frederick,T., Bertolli,J., Lindegren,M.L., Holmberg,S., and Jones,J.L. 2000. Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis.* **30 Suppl 1**:S5-14.
19. Maini,R., Henderson,K.L., Sheridan,E.A., Lamagni,T., Nichols,G., Delpech,V., and Phin,N. 2013. Increasing *Pneumocystis pneumonia*, England, UK, 2000-2010. *Emerg. Infect. Dis.* **19**:386-392.
20. Carmona,E.M., and Limper,A.H. 2011. Update on the diagnosis and treatment of *Pneumocystis pneumonia*. *Ther. Adv. Respir. Dis.* **5**:41-59.
21. Tasaka,S., and Tokuda,H. 2012. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. *J. Infect. Chemother.* **18**:793-806.
22. Reid,A.B., Chen,S.C., and Worth,L.J. 2011. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients: new risks and diagnostic tools. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **24**:534-544.
23. Limper,A.H., Offord,K.P., Smith,T.F., and Martin,W.J. 1989. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**:1204-1209.

24. Chatterton, J.M., and Yen, D.O. 1992. Laboratory investigation of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Genitourin. Med.* **68**:336-341.
25. Ng, V.L., Yajko, D.M., McPhaul, L.W., Gartner, I., Byford, B., Goodman, C.D., Nassos, P.S., Sanders, C.A., Howes, E.L., Leung, G. et al 1990. Evaluation of an indirect fluorescent-antibody stain for detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* **28**:975-979.
26. Midgley, J., Parsons, P., Leigh, T.R., Collins, J.V., Shanson, D.C., Husain, O.A., and Harcourt-Webster, J.N. 1989. Increased sensitivity of immunofluorescence for detection of *Pneumocystis carinii*. *Lancet* **2**:1523.
27. Arendrup, M.C., Bille, J., Dannaoui, E., Ruhnke, M., Heussel, C.P., and Kibbler, C. 2012. ECIL-3 classical diagnostic procedures for the diagnosis of invasive fungal diseases in patients with leukaemia. *Bone Marrow Transplant.* **47**:1030-1045.
28. Zaman, M.K., Wooten, O.J., Suprahmanya, B., Ankobiah, W., Finch, P.J., and Kamholz, S.L. 1988. Rapid noninvasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* from induced liquefied sputum. *Ann. Intern. Med.* **109**:7-10.
29. 2012. *Pneumocystis jirovecii* 2012 EQA Programme Final Report. QCMD.
30. Fillaux, J., Malvy, S., Alvarez, M., Fabre, R., Cassaing, S., Marchou, B., Linas, M.D., and Berry, A. 2008. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J. Microbiol. Methods* **75**:258-261.
31. Larsen, H.H., Huang, L., Kovacs, J.A., Crothers, K., Silcott, V.A., Morris, A., Turner, J.R., Beard, C.B., Masur, H., and Fischer, S.H. 2004. A prospective, blinded study of quantitative touch-down polymerase chain reaction using oral-wash samples for diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in HIV-infected patients. *J. Infect. Dis.* **189**:1679-1683.
32. Helweg-Larsen, J., Jensen, J.S., and Lundgren, B. 1997. Non-invasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in haematological patients using PCR on oral washes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **44**:59S.
33. Onishi, A., Sugiyama, D., Kogata, Y., Saegusa, J., Sugimoto, T., Kawano, S., Morinobu, A., Nishimura, K., and Kumagai, S. 2012. Diagnostic accuracy of serum 1,3-beta-D-glucan for pneumocystis jirovecii pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Microbiol.* **50**:7-15.
34. Karageorgopoulos, D.E., Vouloumanou, E.K., Ntziora, F., Michalopoulos, A., Rafailidis, P.I., and Falagas, M.E. 2011. beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **52**:750-770.
35. Karageorgopoulos, D.E., Qu, J.M., Korbila, I.P., Zhu, Y.G., Vasileiou, V.A., and Falagas, M.E. 2013. Accuracy of beta-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**:39-49.
36. Held, J., Koch, M.S., Reischl, U., Danner, T., and Serr, A. 2011. Serum (1->3)-beta-D-glucan measurement as an early indicator of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and evaluation of its prognostic value. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**:595-602.
37. Matsumura, Y., Ito, Y., Inuma, Y., Yasuma, K., Yamamoto, M., Matsushima, A., Nagao, M., Takakura, S., and Ichiyama, S. 2012. Quantitative real-time PCR and the (1->3)-beta-D-glucan assay for differentiation between *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**:591-597.
38. Damiani, C., Le, G.S., Da, C.C., Virmaux, M., Nevez, G., and Totet, A. 2013. Combined quantification of pulmonary *Pneumocystis jirovecii* DNA and serum (1->3) beta-D-glucan for differential diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* and *Pneumocystis* colonization. *J. Clin. Microbiol.*
39. Walzer, P.D., Foy, J., Steele, P., Kim, C.K., White, M., Klein, R.S., Otter, B.A., and Allegra, C. 1992. Activities of antifolate, antiviral, and other drugs in an immunosuppressed rat model of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1935-1942.
40. Huang, L., Crothers, K., Atzori, C., Benfield, T., Miller, R., Rabodonirina, M., and Helweg-Larsen, J. 2004. Dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis* and sulfa resistance. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:1721-1728.
41. Dini, L., du, P.M., Frean, J., and Fernandez, V. 2010. High prevalence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* isolated from patients with *Pneumocystis pneumonia* in South Africa. *J. Clin. Microbiol.* **48**:2016-2021.
42. Friaiza, V., Morilla, R., Respaldiza, N., de La, H.C., and Calderon, E.J. 2010. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations among colonized individuals and *Pneumocystis pneumonia* patients from Spain. *Postgrad. Med.* **122**:24-28.
43. Taylor, S.M., Meshnick, S.R., Worodria, W., Andama, A., Cattamanchi, A., Davis, J.L., Yoo, S.D., Byanyima, P., Kaswabuli, S., Goodman, C.D. et al 2012. Low prevalence of *Pneumocystis pneumonia* (PCP) but high prevalence of pneumocystis dihydropteroate synthase (dhps) gene mutations in HIV-infected persons in Uganda. *PLoS. One.* **7**:e49991.

44. Munoz,C., Zuluaga,A., Restrepo,A., Tobon,A., Cano,L.E., and Gonzalez,A. 2012. Molecular diagnosis and detection of *Pneumocystis jirovecii* DHPS and DHFR genotypes in respiratory specimens from Colombian patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **72**:204-213.
45. Dimonte,S., Berrilli,F., D'Orazi,C., D'Alfonso,R., Placco,F., Bordini,E., Perno,C.F., and Di,C.D. 2013. Molecular analysis based on mtLSU-rRNA and DHPS sequences of *Pneumocystis jirovecii* from immunocompromised and immunocompetent patients in Italy. *Infect. Genet. Evol.* **14**:68-72.
46. Beser,J., Dini,L., Botero-Kleiven,S., Krabbe,M., Lindh,J., and Hagblom,P. 2012. Absence of dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis jirovecii* isolated from Swedish patients. *Med. Mycol.* **50**:320-323.
47. Kovacs,J.A., Hiemenz,J.W., Macher,A.M., Stover,D., Murray,H.W., Shelhamer,J., Lane,H.C., Urmacher,C., Honig,C., Longo,D.L. et al 1984. *Pneumocystis carinii* pneumonia: a comparison between patients with the acquired immunodeficiency syndrome and patients with other immunodeficiencies. *Ann. Intern. Med.* **100**:663-671.
48. Information från Läkemedelsverket 2011. Profylax och behandling av invasiv svampinfektion vid hematologisk sjukdom samt efter stamcellstransplantation – uppdaterad rekommendation. 36-47.
49. Alanio,A., Desoubeaux,G., Sarfati,C., Hamane,S., Bergeron,A., Azoulay,E., Molina,J.M., Derouin,F., and Menotti,J. 2011. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**:1531-1537.

2.14 Mikrobiologisk diagnostikk av endemiske mykoser

Kjersti Wik Larssen, Mikrobiologisk avdeling, St.Olav

Endemiske mykoser skyldes i hovedsak *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides spp*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* og *Penicillium marneffei*.

Artene har følgende fellestrekk:

- Et endemisk område der de fins i jordsmonn.
- Produksjon av luftbårne konidier som kan inhaleres (eller traumatisk inokulasjon).
- Evne til å gi infeksjon hos immunfriske i tillegg til immunsupprimerte.
- Eksponering er vanlig i endemiske områder, men sykdom er ofte subklinisk og/ eller selvbegrensende. Alvorlig sykdom ofte relatert til smittedose og vertsfaktorer.
- Evne til dimorfisme. Vokser som muggsopp i miljø (25-30 °C), som gjærsopp ved infeksjon (37 °C).

Soppene gir ofte ett av følgende sykdomsbilder:

- Primærinfeksjon
- Kronisk pulmonær og/eller disseminert infeksjon
- Reaktivert infeksjon

Også *Sporothrix schenckii* er en dimorf sopp som ofte inkluderes i endemiske mykoser. Fins i tropiske og subtropiske områder. Gir hyppigere infeksjon via traumatisk inokulasjon enn via inhalasjon.

For informasjon om geografisk utbredelse, økologisk nisje, sykdomsmanifestasjoner og utredning henvises til lærebøker. Kliniske opplysninger man bør være særlig oppmerksom på: reise, tidligere bosted, yrke, fritidsaktiviteter, immunsuppresjon. Vær oppmerksom på mulighet for reaktivert infeksjon ved nytilkommet immunsuppresjon, også mange år etter opphold i endemisk område.

Biosafety:

Laboratoriesmitte med dimorfe sopper er velkjent. Mikrobene tilhører smitterisikogruppe 3. Pasientmateriale med dimorfe sopper er ikke smittsomt. I muggsoppfase (25-30 °C) dannes svært smittsomme konidier. Også gjærsoppfasen i kultur ved 37 °C kan være smittsom ved dannelse av aerosoler eller inokulasjon. Ved mistanke skal dyrkning skje på et P3 laboratorium, og all manipulasjon av kulturer må skje i biosikkerhetskabinett klasse II (BSC-II). CLSI anser imidlertid biosikkerhetsnivå (BSL)-2 med bruk av BSL-3 beskyttelse som BSC-II for å være tilstrekkelig til å isolere og identifisere arter som for eksempel *Coccidioides* spp, *Histoplasma* spp fra pasientmateriale (1). Prøver skal såes ut i et BSC.

De fleste anbefaler dyrkning i rør (ca 20 mm diameter) med skrukork for å minimere smittefare i forbindelse med håndtering av kulturer. Dersom mistanke om coccidioidomykose frarådes ofte å dyrke i petriskåler. Om petriskåler benyttes skal de alltid forsegles med parafilm eller tilsvarende.

For å drepe en hel kultur før mikroskopering kan hele kulturen dekket med 10 % formalin som får virke i 48 timer (2). Forutsetter nok et BSC som håndterer kjemikalier (uten resirkulasjon av luft til laboratoriet). Ved referanselaboratoriet i Sverige kontrollerer de i tillegg til formalindrap at soppen er død ved subkultur før de lager preparat og tar den ut av sikkerhetskabinettet (personlig kommunikasjon Erja Chryssantou, Karolinska instituttet). Fenolkomponenten i lactofenolblått (LPCB) vil også drepe sopp. Litteraturen sier ikke noe om hvor lenge fenolkomponenten må virke, og om hvor sikkert soppdrapet er. Formalindrap før morfologisk identifikasjon av en kultur mistenkt å kunne inneholde dimorfe sopper er ikke nevnt i verken i Manual of clinical microbiology, Clinical microbiology procedures handbook eller CLSI guidelines (1,8,9).

Manual of clinical microbiology anbefalte i tidligere utgave (8th ed) bruk av Permout mounting medium som forsegling for ekstra sikkerhet før mikroskopering. Som ekstra personlig sikkerhetstiltak kan eventuelt P3 maske benyttes når preparat tas ut av sikkerhetskabinett.

Gravide bør om det kan unngås ikke jobbe med kulturer som mistenkes å kunne inneholde *Coccidioides* spp. Dersom uheld i lab med kultur som viser seg å være *Coccidioides* spp finnes det en god oversiktsartikkel over anbefalte tiltak fra 2009 (3). Mange av vurderingene her rundt smittefare ved ulike situasjoner er nyttige også til bruk ved risikovurderinger ved andre sopptyper.

Aktuelle prøvematerialer:

Organismene overlever ikke godt i kliniske materialer, og må håndteres straks etter prøvetaking for optimal vekst. Dette gjelder særlig ved histoplasmose.

Aktuelle prøvematerialer er blant annet:

- Luftveismateriale (BAL, ekspektorat, indusert sputum, biopsi)
- Beinmargaspirat
- Lymfeknuteaspirat
- Spinalvæske
- Hudbiopsier (fra lesjoner) evt hudavskrap
- Fullblod på 2 lysis- sentrifugering (Isolator) flasker (mer sensitiv enn automatiske blodkultursystem)
- Biopsier
- Aspirat

Direkte mikroskopi:

Alle materialer farges med Calcofluor White/Blankophor + KOH. Eventuelt rent KOH preparat ved behov i tillegg. Giemsa på blodutstryk og på beinmarg. Alltid tillegg av histopatologiske fargemetoder (GMS, H&E og PAS) på biopsier/vev, beinmarg og blodutstryk. Se etter typiske karakteristika og sammenlign med atlas/ lærebøker:

Organisme	Størrelse (µm)	Uniform/ Variabel størrelse	Karakterisitka i prøvemateriale
<i>H.capsulatum</i>	2-5	Oftest uniform	Ovale/runde knoppskytende gjærceller. Ofte ansamlinger i makrofager. Vanskelig å se når få. Histopatologi: ofte pseudokapsel.
<i>S.schenckii</i>	2-6	Variabel/ sfæriske el avlange	Små rund-ovale-elongerte celler ("cigar bodies"). Mono eller multipolar knoppskyting. Histopatologi: polygranulomatøs respons. Ofte få gjærceller i lesjoner. Kan være vanskelig å se.
<i>P.marneffeii</i>	2-5	Variabel	Små, ovale/avlange artroconidiale former uten knoppskyting. Karakteristisk internt septa. Intracellulære.
<i>B.dermatitidis</i>	8-15	Uniform (ikke alltid)	Store, sfæriske dobbelt refraktære celler. Tykkveggede. Monopolar knoppskyting med bred base. Kan se multinucleate ut.
<i>H.duboisii</i>	8-15 (evt 150)	Variabel	Smal base. Kan ha "timeglass" utseende. Tykk cellevegg. Kan likne <i>B.dermatitidis</i> .
<i>Coccidioides spp</i>	10-200	Variabel	Sfæruler av variabel størrelse, noen med 2-4 µm endosporer. Diagnostisk. Etter ruptur kan endosporer likne gjærceller. OBS fravær av knoppskyting! Artrokonidier/hyfer kan dannes i kavitære lesjoner.
<i>P.brasiliensis</i>	5-60	Variabel	Store celler med multipolar budding/"skipsratt". Ovale datterceller kan likne <i>H.capsulatum</i> .

Funn suspekt på endemisk mykose i klinisk materiale ringes til kliniker straks. Vurder mulig nytte av supplerende tester (ITS PCR på direktmateriale, serologi).

Dyrkning:

Dyrkningen av endemiske mykoser kan ta tid for enkelte arter. Skåler/rør inkuberes i inntil 6 uker. Sannsynligheten for vekst varierer med sykdomsbilde og prøvemateriale. Repeterte prøver kan øke sensitiviteten.

- Sterilt materiale dyrkes på SDA og BHI agar (eventuelt sjokoladeagar) ved 25-30 °C og 35-37 °C.
- Usterilt materiale dyrkes som over og i tillegg på medier tilsatt kloramfenikol ved 35-37 °C og 25-30 °C og medier tilsatt kloramfenikol og cykloheximide (for eksempel Mycosel, Mycobiotic) ved 25-30 °C.
- Blodkultur på Isolatorsystem er godt egnet for coccidioidomykose og histoplasmose. Lysis av hvite blodceller (frigir fagocyterte gjærformer) sammen med konsentrasjon (sentrifugering) øker sannsynligheten for vekst. Prøvene håndteres i henhold til leverandør. Sås ut på samme medier og betingelser som sterilt materiale.

Kloramfenikol hindrer bakterievekst. Cycloheximid hemmer vekst av mange forurensende muggsopp, men også av gjærsoppformen til de fleste dimorfe sopper og muggsoppformen til *Penicillium marneffei* og *Sporothrix schenckii*. Selektive medier kan derfor ikke benyttes alene.

De fleste muggsoppformene vil vokse innen 1-2 uker, noen allerede etter 3-5 dager. Konidieproduksjon kan ta mer tid, ofte 5-10 dager. Smittefaren i laboratoriet øker jo eldre kulturene blir, ettersom luftmycel og konidier får utvikle seg. *Coccidioides spp* vokser ikke med gjærsoppform i laboratoriet med mindre man benytter spesialmedier eller forsøksdyr.

Identifikasjon:

Identifikasjon foregår morfologisk og/ eller ved hjelp av molekylære metoder. Generelt vil identifikasjon via prober (for eksempel Accuprobe (GenProbe)) eller sekvensering (av ITS2 regionen til rRNA) kunne være raskere enn morfologisk identifikasjon da dette kan utføres på mycelfase, før typiske konidier og/eller konversjon til gjærsoppfasen tillater sikker morfologisk diagnostikk. Slik vil en også minske faren for laboratoriesmitte. Exoantigentest er beskrevet i litteraturen som en sensitiv og spesifikk måte å identifisere kulturer på fra mycelform (før konidieproduksjon). Dette er arbeids- og tidkrevende (48-72 timer), krever en viss kolonistørrelse før en kan ekstrahere nok antigen, og er mange steder nå erstattet med molekylære metoder.

Demonstrasjon av termal dimorfisme har tradisjonelt vært den definitive testen for identifikasjon av dimorfe sopp. For *coccidioides spp* er dette ikke praktisk gjennomførbart i rutinelaboratorier, og også for enkelte av de andre kan det kreve tid (1-4 uker), flere subkulturer eller spesielle medier. Stort sett vil BHI agar med blod fungere for konversjon fra muggsoppfasen til gjærfasen. Det henvises til lærebøker for konkrete anbefalinger om teknikk og medier, for eksempel referanse 9.

Både morfologisk identifikasjon, men også via prober er beskrevet å kunne gi falsk positiv identifikasjon (12,13). Ved bruk av sekvensbaserte metoder må man være klar over fallgruvene i, og kvaliteten på, tilgjengelige sekvensdatabaser (22).

Rikshospitalet tilbyr sekvensbasert identifikasjon av sopp. Unge kolonier overføres til transportmedium (Amies) og kan sendes som kategori A materiale for sekvensering.

Ved morfologisk identifikasjon av kultur ser en etter typiske karakteristika makroskopisk og mikroskopisk, og sammenligner med atlas/lærebøker, for eksempel referanse 4 el 6. Bruk fortrinnsvis "tease"-preparat med inokulasjonsnåler fra dyrkning i rør (8). (Noen lærebøker fraråder tape-preparat ved mistanke om endemiske mykoser. Tape-preparat vil dessuten kun kunne brukes om dyrkningen er gjort på petriskåler). Utfør aldri "slide culture" på mistenkte P3 organismer på grunn av smittefare!

Serologiske undersøkelser:

Antistoffundersøkelser har primært vært brukt ved coccidioidomykose og histoplasmose. Serologi for coccidioidomykose anses som følsom, for histoplasmose akseptabel men med kryssreaksjoner. For paracoccidioidomykose er det problem med kryssreaksjoner. Serologiske tester for blastomykose er lite nyttige pga lav sensitivitet, men spesifisiteten er god. Sensitivitet i testene vil påvirkes av eventuell immunsvikt. Vanligst brukt er immundiffusjonstest (ID) eller KBR. For coccidioidomykose er det anbefalt at det benyttes

ulike teknikker for å øke sensitiviteten (ID + KBR + EIA). KBR kan også benyttes på CSF ved mistanke om coccidioidomykose. Også ved histoplasmose kan man øke sensitiviteten ved å bruke både ID og KBR. Det kan ta opptil 4-8 uker før antistoffrespons. Det fins også beskrevet ELISA for påvisning av antistoffer mot *Penicillium marneffeii*. Rikshospitalet utfører antistoffundersøkelse med ID test for *H.capsulatum*, *Coccidioides spp* og *B. dermatitidis*.

Det fins EIA- tester for antigenpåvisning av Histoplasma (IMMY og Mira Vista Laboratories), Coccidioides og Blastomyces (Mira Vista Laboratories) fra urin, serum, CSF og BAL. Sensitiviteten er ofte størst i urinprøver. Kryssreaksjoner forekommer. Det er også beskrevet tester for antigenpåvisning av *P.marneffeii*. Testene er mest nyttige i endemiske områder, og kan også brukes til å følge behandlingsrespons. Per i dag finnes ikke tilbud om dette i Norden.

Direkte påvisning av dimorfe sopp med PCR på pasientmateriale:

Det fins flere publikasjoner på bruk av molekylære metoder for direkte påvisning av dimorfe sopp i prøvematerialet. Også bruk av panfungal assays til deteksjon av sopp fra klinisk materiale er beskrevet. Foreløpig er ingen slike tester kommersielt tilgjengelige, og deres endelige plass i diagnostikken er ikke avklart.

Referanser:

1. CLSI M54-A. Vol32 No14. 2012: Principles and procedures for detection of fungi in clinical specimens-direct examination and culture; approved guideline.
2. Referensmetodik.smi.se. Referensmetodik: Svampinfeksjoner. Identifisering-Endemiska mykoser.
3. Stevens DA, Clemons KV, Levine HB et al. Expert opinion: What to do when there is *coccidioides* exposure in the laboratory. CID 2009;49:919-23.
4. Larone DH. Medically Important Fungi. A guide to identification, 5th ed, ASM Press, Washington, DC, 2011.
5. Guarner J, Brandt ME. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. Clin Microb Rev 2011; 24: 247-280.
6. De Hoog GS, Guarro J, Figueras G & MJ. Atlas of clinical fungi. 3d edition.
7. Reiss E, Shadomy H.J, Lyon GM. Fundamental medical mycology. Wiley –Blackwell publishing 2012.(ISBN 978-0-470-17791-4)
8. Manual of Clinical Microbiology, Ed. Murray et al, Section VII Fungi. ASM Washington DC. 10th ed, 2011, vol 2, side 697-846
9. Garica LS. Clinical Microbiology procedures handbook, 3d ed, vol2, ch 8. ASM press 2010.
10. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. 2d ed. Churchill Livingstone, Elsevier. 2009.
11. Lau A, Chen S, Sleiman S, Sorrell T. Current status and future perspective on molecular and serological methods in diagnostic mycology. Future microbiol 2009; 4: 1185-1222.
12. Brandt ME, Gaunt D, Iqbal N et al. False-positive *Histoplasma capsulatum* Gen-probe Chemiluminescent test result caused by a *Chrysosporium species*. JCM 2005; 43:1456-1458.
13. Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. Clin Microbiol Rev 2007;20: 115-132.
14. Chang P, Rodas C. Skin lesions in histoplasmosis. Clinics in Dermatology 2012;30:592-598.
15. Smith JA, Kauffman CA. Blastomycosis. Proc Am Thorac Soc 2010;7:173-180.
16. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ. Blastomycosis. Clinics in Dermatology 2012;30:565-572.
17. Lima Barros MB de, Almeida Paes R de, Schubach AO. Sporothrix schenckii and sporothricosis. Clin Microbiol Rev 2011;24:633-654.
18. Vanittanakom N, Cooper Jr CR, Fisher MC et al. Penicillium marneffeii infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects. Clin Microbiol Rev 2006;19:95-110.
19. Welsh O, Vera-Cabrera L, Rendon A et al. Coccidioidomycosis. Clinics in dermatology 2012;30:573-591.

20. Teles FRR, Martins ML. laboratory diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. *Talanta* 2011; 85:2254-2264.
21. Lindsley MD, Hurset SF, Iqbal N et al. Rapid identification of dimorphic and yeast like fungal pathogens using specific DNA probes. *J Clin Microbiol* 2001;39:3505-3511.
22. Lau A, Chen S, Sorrel T et al. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. *J Clin Microbiol* 2007; 45:380-385.
23. Badaby NE, Buckwalter SP, Hall L et al. Detection of blastomyces dermatitidis and Histoplasma capsulatum from culture isolates and clinical specimens by use of real time PCR. *J.Clin.Microbiol.*2011;49:3204-3208.
24. Stockman L, Clark KA, Hunt JM et al. Evaluation of commercially available acridinium ester-labeled chemiluminescent DNA probes for culture identification of Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis, Cryptococcus neoformans and histoplasma capsulatum. *J Clin microbial* 1993;31:845-850.
25. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the infectious diseases society (IDSA) and the American society for microbiology (ASM). *CID* 2013; 57:e22-121.

2.15 Laboratoriesikkerhet ved håndtering av klasse 3 agens i mykologien

Egil Lingaas, Avdeling for smittevern, OUS Rikshospitalet

<http://mikrobiologi.fhi.no/PageFiles/3302/17%20Laboratoriesikkerhet%20ved%20soppdiagnostikk%202.pdf>

Oppsummering og anbefaling:

For generelle smittevernrutiner i laboratoriet henvises til tidligere strategirapport (1999). Innen mykologien er dannelse av aerosol eller inhalasjon av konidier fra især fra kulturer med *Coccidioides immitis* og *Histoplasma capsulatum* i muggfasen fryktet som årsak til laboratoriesmitte. Det foreligger også rapporter om inokulasjonssmitte ved håndtering av prøver eller kulturer. Slik smitte rapporteres også fra lavendemiske områder ofte i forbindelse med uventet funn av dimorf sopp. Økende reisevirksomhet og økende antall immunsupprimerte pasienter gjør at slik smitte også kan inntreffe i Norge. Reiser til endemiske områder i USA, men også mer eksotiske reisemål kan medføre smitte og latent sykdom, også hos ellers friske pasienter, med fare for akutt sykdom i forbindelse med massiv eksponering eller reaktivering i forbindelse med senere immunsuppresjon. Faren for laboratorieuhell størst om man ikke har laboratorierutiner som tar høyde for potensiell smitterisiko. *Penicillium marneffe* er en dimorf sopp som kategoriseres som risikogruppe 2.

Sopp i risikogruppe 3 der luftbåren smitte ikke er utelukket ¹

Sopp	Smitte
<i>Blastomyces dermatitidis</i> (<i>Ajellomyces dermatitidis</i>)	Inhalasjon. Inokulasjon. Smitte mellom mennesker er sjelden. Laboratoriesmitte (inhalasjon, inokulasjon)
<i>Cladophialophora bantiana</i> (<i>Xylohypha bantiana</i> , <i>Cladosporium bantianum</i>)	Fra jord/planter. Ikke kjent om det smitter mellom mennesker
<i>Coccidioides immitis/ posadasii</i>	Fra jord. Inhalasjon av støv. Inokulasjon Laboratoriesmitte (inhalasjon, inokulasjon)
<i>Histoplasma capsulatum var capsulatum</i> (<i>Ajellomyces capsulatus</i>)	Inhalasjon av jord/støv forurenset med avføring fra fugler eller flaggermus. Laboratorieinfeksjon (inhalasjon, inokulasjon)

Sopp	Smitte
<i>Histoplasma capsulatum duboisii</i>	Fra jord. Inhalasjon av støv. Laboratorieinfeksjon (inhalasjon, inokulasjon)
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Fra jord. Inhalasjon. Smitter ikke mellom mennesker. Gir ikke laboratorieinfeksjon

Dannelse av aerosoler er en viktig årsak til laboratoriesmitte og inntreffer i forbindelse med homogenisering, vibrasjoner (vortex-mikser), sentrifugering, pipettering, avbrenning av preparater, katalase, agglutinasjon, frysesnitt og åpning av skåler med mycel. For muggsopp og dimorf sopp i muggstadiet er inhalasjon av konidier viktig smittekilde. Fornuftig bruk av sikkerhetskabinett og riktig inneslutningsnivå vil minimere fare for laboratoriesmitte, men tiltakene må være hensiktsmessige, slik at de følges i den daglige rutinen. Det vil også være hensiktsmessig å ha en rutine for hva som skal gjøres om uhellet er ute (2).

Det er ikke automatisk samsvar mellom risikogruppe og inneslutningsnivå, og internasjonale anbefalinger er ikke helt identiske.

Håndtering av prøvemateriale ved mistanke om dimorfe sopp

Inneslutningsnivå 2

Håndtering av muggsopp

Mikrobiologisk sikkerhetskabinett klasse 2

Håndtering av dimorfe sopp

Ved håndtering av kulturer: Inneslutningsnivå 3. Drep kulturen før den blir gammel (<7d)

Inaktivering av konidier

Bomullsblått (lactophenol cotton blue) inneholder 20 - 25 % (2 - 2,5 mg/ml) fenol (C₆H₅OH)

Fenol har antimykotisk effekt.

Mange anbefaler å spre ut prøvematerialet i 70 % alkohol før bomullsblått blandes inn.

Det anbefales å ikke lage slide culture av P3 organismer. Tease preparat med inokulasjonsnåler er å foretrekke over tape preparat pga mindre mengde konidier og bedre kontroll med at alt materialet blir dekket av bomullsblått. (obs det finnes bomullsblått uten lactophenol!).

Kulturer med muggsopp

Alltid tapede skåler, ved sterk mistanke om dimorf sopp anbefales gjerne dyrkning i rør med skråagar og skrukork (mindre overflate/ konidier).

Åpning i sikkerhetskabinett klasse 2 (1?)

Skåler som åpnes uten at man har sett muggsopp, skal straks lukkes og flyttes til et sikkerhetskabinett

Skåler som tas vare på i mer enn 3 dager ved romtemperatur skal tapes.

Referanser:

1. http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/bmb15_sect_viii_b.pdf
2. Stevens DA, Clemons KV, Levine HB et al. Expert opinion: What to do when there is *coccidioides* exposure in the laboratory. CID 2009;49:919-23.
3. CLSI M54-A. Vol32 No14. 2012: Principles and procedures for detection of fungi in clinical specimens- direct examination and culture; approved guideline.
4. Referensmetodik.smi.se. Referensmetodik:Svampinfeksjoner. Identifisering-Endemiska mykoser.

2.16 Mikrobiologisk diagnostikk ved dermatofyttinfeksjoner

Aasmund Fostervold, Mikrobiologisk avdeling, Stavanger universitetssykehus

Dermatofytter er muggsopparter som tilhører *Trichophyton*, *Microsporum* og *Epidermophyton*-familiene. De kan bryte ned keratin og således infiserer hud, negler og hår. Taksonomien er komplisert[1, 2], men en hensiktsmessig inndeling kan baseres på vertspreferanse og naturlig habitat[3, 4].

- Antropofile arter – smitter direkte eller indirekte mellom mennesker
- Zoofile arter– smitter fra dyr. Sekundærsmitte mellom mennesker forekommer
- Geofile arter – smitter fra jord til menneske direkte eller via dyr.

Tabell 1 – Artsoversikt

Anthropofile arter	Geofile arter	Zoofile arter(typisk vertspreferanse)
<i>Trichophyton concentricum</i>	<i>Trichophyton vanbreuseghemii</i>	<i>Trichophyton erinacei</i> (pinnsvin)
<i>Trichophyton gourvilii</i>	<i>Microsporum preacox</i>	<i>Trichophyton equinum</i> (hest)
<i>Trichophyton mentagrophytes interdigitale</i>	<i>Microsporum racemosum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes mentagrophytes</i> (gnagere)
<i>Trichophyton megnini</i>	<i>Microsporum gypseum complex</i>	<i>Trichophyton quinckeanum</i> (mus)
<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Microsporum vanbreuseghemii</i>	<i>Trichophyton simii</i> (aper??)
<i>Trichophyton schoenleinii</i>		<i>Trichophyton verrucosum</i> (kveg)
<i>Trichophyton soudanense</i>		<i>Microsporum canis</i> (katter,hunder)
<i>Trichophyton tonsurans</i>		<i>Microsporum gallinae</i> (kylling)
<i>Trichophyton violaceum</i>		<i>Microsporum nanum</i> (gris)
<i>Trichophyton yaoundei</i>		<i>Microsporum persicolor</i> (gnagere,små pattedyr))
<i>Microsporum audouinii</i>		
<i>Microsporum ferrugineum</i>		
<i>Epidermophyton floccosum</i>		

Bearbeidet tabell fra referanse.[3]

Enkelte arter forekommer hyppigere ved enkelte anatomiske lokalisasjoner.(tabell 3)

Trichophyton spp. kan infisere både hud, hår og negler. *Microsporum spp.* og *Epidermophyton spp.* påvises svært sjelden i henholdsvis negl og hår.

T. rubrum, *T. mentagrophytes interdigitale*, *M.canis* og *E.floccosum* finns utbredt i hele verden. Utbredelsen av andre arter er i større eller mindre grad geografisk betinget. Utbredelsen kan endres over tid som følge av folkemigrasjon, turistreiser eller endring i sosioøkonomiske forhold. F.eks øker nå forekomsten i Europa og USA av *T.soudanense*(endemisk i Asia og Afrika) på grunn av migrasjon[4, 5].

Den vanligste arten i Sverige er *T.rubrum*(80%) fulgt av *T.mentagrophytes*, *E.floccosum* og *M. canis*. Disse utgjør til sammen over 90%. [6] Det finnes lite publiserte om norske forhold. I en norsk studie fra 1984 ble det hos 385 rekrutter påvist tinea pedis hos 6 %. Det ble påvist *T.rubrum* hos ca 80 % og *E.floccosum* hos ca. 20 % [7]. I boken Medisinsk mikrobiologi angis det at *T.rubrum* utgjør 85-90 % av norske isolat, fulgt av *T.mentagrophytes*, *T.violaceum* og *E.floccosum*[8].

I en spørreundersøkelse til norske laboratorier i forkant av møtet fikk vi svar fra 8 laboratorier som utfører dermatofytt diagnostikk. Samlet ble det i 2012 funnet dermatofytter i 1088 (18 %) av i 6048 prøver. Variasjon i funnrater mellom laboratoriene var 11-28 %. Seks laboratorier rapporterte fordeling av prøvematerialer; Her fordelte 4643 prøver seg i 2693 (58 %) negl, 1903 (41%) hud og 47 (1%) hår. Fordelt på prøvemateriale vokste det dermatofytter i 22 % av neglprøvene, 37 % av hårprøvene og 15 % av hudprøvene.

Tabell 2 - Artsfordeling vekst 8 norske laboratorier

Art	Antall prøver med vekst	% av antall påvist
<i>Trichophyton rubrum</i>	874	80,5 %
<i>Trichophyton violaceum</i>	62	5,7 %
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	59	5,4 %
<i>Trichophyton species</i>	39	3,6 %
<i>Microsporum canis</i>	13	1,2 %
<i>Trichophyton tonsurans</i>	12	1,1 %
<i>Epidermophyton floccosum</i>	9	0,8 %
<i>Microsporum andouinii</i>	8	0,7 %
<i>Trichophyton soudanese</i>	5	0,5 %
<i>Trichophyton megninii</i>	2	0,2 %
<i>Trichophyton verrucosum</i>	1	0,1 %
<i>Microsporum gypseum</i>	1	0,1 %
<i>Microsporum ferrugineum</i>	1	0,1 %

I tillegg rapporterte enkelte sporadiske funn (<1%) av andre sopparter. *Fusarium* spp., *Scopulariopsis* spp., mugg, *Aspergillus* spp. og gjærsopp.

Kommentar: Ringtestprøver er inkludert i resultatene fra ett laboratorium. En del tinea capitis prøver er sannsynligvis registrert som hudprøver. Det er også rimelig å anta at en del infeksjoner, særlig tinea pedis og tinea cruris behandles uten diagnostikk.

Non dermatofytt-infeksjon

Candida intertrigo er hyppig forekommende. *Malassezia* spp. (gjærsopp), hyppigst *M. furfur*, kan gi pityriasis (tinea) versicolor, seborroisk dermatitt, og follikulitt [9, 10].

Non-dermatofytt muggarter, utenom dermatofyttene som kan infisere frisk hud, deriblant *Scytalidium dimidiatum*, *Scytalidium hyalinum*, *Phaeoannellomyces werneckii*, *Piedraia hortae* (Hvit Piedra), *Trichosporon beigeli* (Svart Piedra), *Fusarium* spp. Mange forekommer hovedsakelig i varme strøk. Overnevnte og en rekke andre arter kan infisere hud eller negler som har skade, eller eksisterende dermatofyttinfeksjon. *Scopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Scytalidium dimidiatum* og *Acremonium* spp. er de hyppigst rapporterte i litteraturen. *Candida* spp., særlig *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* og *C. albicans* kan også være aktuelle. [10-13]

Vekst av «uvanlige» arter, særlig i negleprøver, bør medføre evt. litteraturkonsultasjon, vurdering mot direkte mikroskopi. Ny prøve anbefales for repetering av funn. Det bør undersøkes om en «vanlig» dermatofytt også er tilstede [14] og behandlende lege bør vurdere om tilstanden kan skyldes ikke-infeksiøs årsak (tabell 3).

Subkutane mykoser, dimorfe soppinfeksjoner og hematogen spredning av andre systemiske soppinfeksjoner kan også gi overfladiske lesjoner [10]. Omtales ikke nærmere her.

Klinikk og behandling

Klinisk presentasjon avhenger av soppart, kroppsområde og vertens immunstatus. Invasiv vekst forekommer svært sjelden, men kan være aktuelt hos immunsvekkede [15]. T-celle respons antas å være den viktigste forsvarsmekanismen. Antropofile arter gir oftere lite

inflammasjon og kronisk infeksjon. Zoofile arter gir oftere inflammatoriske lesjoner og noen ganger større pustellesjoner(kerion).

Tabell 3 – Klinisk presentasjon

Tilstand	Lokalisasjon	Klinikk	Typiske diff.diagnoser	Hyppe årsak(usortert)*
Tinea capitis	Hodebunn og hår	Oftest hos barn 3-7 år. Varierer fra misfargede, avbrutte hårstrå til smertefulle betennelsesområder med håravfall. Ringformet.	Serborroisk dermatitt, psoriasis, impetigo, lupus erythematosus.	<i>T. tonsurans</i> (A) <i>T. verrucosum</i> (Z) <i>T. soudanese</i> (A) <i>T. violaceum</i> (A) <i>M. canis</i> (Z)
Tinea favosa	Hodebunn	Alvorlig, kronisk infeksjon. Kan gi permanent hårtap. Vanligst i Asia og Afrika.		<i>T. schonleinii</i> (A)
Tinea barbae	Skjeggområdet med invasjon av hår	Ofte hos bønder. Ofte sterk inflammasjon med pustuløs folikulitt. Infiserte hår kan lett nappes ut. Vanligvis lite plagsom, men kosmetisk skjemmende	Bakterielle folikulitter(kan forekomme samtidig)	<i>T. verrucosum</i> (Z) <i>T. mentagrophytes mentagrophytes</i> (Z)
Tinea faciei	Ansiktshud uten terminal behåring.	Smitte oftest fra kjæledyr eller fra andre kroppsområder. Erythem, men ofte uten ringstruktur. Papler og makler forekommer. Steroidbruk kan gi ukarakteristisk bilde.	Lysdermatoser, Lupus erythematosus, psoriasis, eksem, rosacea	<i>T. rubrum</i> (A)
Tinea pedis	Føtter og mellom tær	Hypigste infeksjon. Prevalens 10%, særlig laterale tå mellomrom hos menn. Smitte i fuktige miljøer. Reinfeksjon veldig vanlig. Flassing, maserasjon og kronisk kløe. Ofte mykotisk eksem. Bakteriell superinfeksjon forekommer ikke sjelden. Er ofte kilde ved infeksjon i negler eller andre lokalisasjoner	Bakteriell infeksjon, psoriasis og andre eksem	<i>T. rubrum</i> (A) <i>T. mentagrophytes interdigitale</i> (A) <i>E. floccosum</i> (A)
Tinea manuum	Hender	Hyperkeratose med finkornet flassing. Eksematøse forandringer forekommer. Ofte ensidig. Ofte smitte fra føttene	Psoriasis, håndeksem	<i>T. rubrum</i> (A)
Tinea cruris	Lyske og lår	lyse og avgrensede områder av lårene- særlig hos menn, fuktige og varme strøk. Sportsmiljøer, sterk svetting.. Ofte smitte fra egne føtter via håndkle. Kløe, symmetrisk vifteformet utslett med flassende elevert randsoner. Affeksjon av skrotum forekommer ofte, spredning til eksterne genitalia, nates, rygg og abdomen forekommer. Papler og pustler kan forekomme	Candida- eller bakteriell interigo, psoriasis, serborroisk eksem, ekstramammær Paget	<i>T. rubrum</i> (A) <i>T. mentagrophytes</i>
Tinea unguinum (onychomycosis)	Negler	Forekommer ofte sammen med tinea pedis. Traumer, dårlig perifer sirkulasjon og høy alder disponerer Neglen invaderes forfra eller fra side. Soppen penetrerer neglen som farges hvit. Negleplaten blir tykk og sprekker lett opp.	Psoriasis, paronychier	<i>T. rubrum</i> (A) <i>T. mentagrophytes</i> (A) <i>E. floccosum</i> (A)
Tinea corporis	Trunkus, skuldre	Ringformede lesjoner.		<i>T. rubrum</i> (A) <i>T. tonsurans</i> (A)
Tinea imbricata	Trunkus	Kronisk infeksjon, konsentriske overlappende ringer. Oceania, sør-øst asia, latin-amerika.		<i>T. concentricum</i> (A)
Tinea incognito	Alle lokalisasjoner	Klinisk uvanlig presentasjon, ofte uten inflammasjonstegn. Skyldes ofte feilbehandling med steroider. Soppen påvises lett med vanlig diagnostikk		

Tabell utarbeidet etter referansene[2, 9, 10, 16]
A)-antropofil, (Z)-zoofil *Vestlig/europeisk epidemiologi

Dermatofyttinfeksjoner har en rekke differensialdiagnoser, avhengig av lokalisasjon, både infeksiose og immunologiske tilstander. Kutane infeksjoner kan vanligvis lokalbehandles i 2-3 uker. For enkelte infeksjoner, særlig i negler og hår er det aktuelt med systemisk behandling. Fingerneglisopp behandles systemisk i 6 uker, tåneglisopp i 12 uker. Terbinafin og itrakonazol/flukonazol er mest bruket. Riktig art kan, særlig ved reinfeksjonsproblem, gi grunnlag for miljøtiltak eller endring av adferd[6, 9]

Undersøkelse, prøvetaking og forsendelse

Sammenfatning av referansene[13, 17].

Skritt, negler og tå mellomrom er ofte smittereservoar, bør undersøkes klinisk dersom en har mistanke om dermatofyttinfeksjon ved andre lokalisasjoner. Kliniker kan ta prøve for egen mikroskopi med KOH eller NaOH. Woods lampe kan også brukes til diagnostikk av Pityriasis

versicolor (*Malazessia furfur*), dersom det er aktuelt med dyrkning må dette angis på rekvisisjonen, da *M.furfur* har spesielle vekstkrav(lipofil).

Løst materialet som hudavskrap, hår og negleavskrap kan samles på et svart papir, som så kan brettes slik at en får en trakt som letter overføring til beholder. Alternativt kan materialet samles mellom to objektglass, men det må da teipes rundt kanten slik at materialet ikke faller ut under transport. Unngå hermetisk lukking ved lengre transport. Prøven bør transporteres tørt og i romtemperatur.

Rekvirenten bør instrueres i å ta rikelig med prøvemateriale.

Hud

Desinfiser først med 70% alkohol. Prøven bør tas i randsonen mot friskt vev. Avskrap kan gjøres med skalpell, eller steril børste, f.eks. tannbørste. Dersom hudområdet er lite flassende kan prøve tas med gjennomsiktig tape, som så klistres på et objektglass.

Negl

Prøven bør tas i randsonen mot friskt vev, fortrinnsvis proksimalt. Skrap med skalpell eller curette, samle opp alt løst materialet. Distale deler av lesjonen har ofte soppelenter som er synlige ved mikroskopi, men som vokser dårlig ved dyrkning. Distale del av neglen kan klippes vekk, slik at en lettere får tatt prøvematerialet fra alle neglelagene. Det kan være vanskelig å få god prøvetaking.

Hår

Infeksjon sitter oftest nær eller i hårroten. Lange hår kan klippes korte (1-2 cm) før prøvetaking. Hårstrå nappes ut med pinsett, infiserte hår løsner lett. En bør tilstrebe å få prøvematerialet fra både hår, hårfollikkel og hodebunn(se Hud over). Woods lampe(UV 365 nm) fluoresere infiserte hårstrå og slik lette prøvetaking ved infeksjon med ectothrix-stammer som *M.canis*, *M.audouinii*, *M.ferrugineum* og *T.schonleinii* Ved kraftig inflammasjon av hodebunnen kan mengden viable soppelenter være liten, slik at repeterte prøver er nødvendige for å få vekst.

Påvisning og identifikasjon

Tabell 4 - Oversikt ulike metodeanbefalinger

Land	Direkte mikroskopi	Medievalg ved primær utsæd	Inkuberingslengde	Temperatur
Norge[18]	Anbefalt	SA-K	2-3-4 uker	25-30
		SA-K-C	Negativt svar etter 2-3 uker	
Sverige[17]	Anbefalt	SA-K	3 uker	30
		DTM-K-C ¹ MBA-K-C		
USA[3]	Anbefalt	(SA-K) ²	Inntil 4 uker	25-30
		SA-K-C		
Storbritannia[13]	Anbefalt	SA-K ³	2 uker	28 (26-30)
		SA-K-C	<ul style="list-style-type: none"> skåler med vekst inkuberes ytterligere 3 uker i romtemperatur for verifikasjon av id negativt svar etter 1 uker, reinkuber i 1 før kast.. ved positiv mikroskopi uten vekst etter 2 uker, reutsæd og reinkubering av orginalskål. Orginalskål undersøkes særskilt for langsomtvoksende arter. (<i>T.verrucosum</i> , <i>T.violaceum</i>).	

1:DTM og MBA ansees likeverdige

2:Dersom en mistenker cycloheximid følsom organisme(typisk nondermatofytt.) Obs. Microsporum-arter i sjeldne tilfeller.

3:Kun for hud og negl primært.

Avlesning av skåler 1-2 ganger per uke.

SA - Sabouraud agar(pepton og glukose) fremmer vekst av de fleste sopparter.

MBA - Mycobiotic agar- (soyaekstrakt og glukose). Fremmer vekst av de fleste sopparter Soyaekstrakt skal stimulere sporulering.

DTM - Dermatophyte Test Medium (soyapepton, glukose, fenolrødt). Produksjon av alkaliske produkt gir fargeomslag ved vekst av dermatofytter. Enkelte non-dermatofyttarter kan også gi fargeomslag (*Trichophyton terrestre*, *Chyrosporium spp.* og andre). Fargeomslag kan i sjeldne tilfeller mangle for enkelte Microsporium-arter.

K - Kloramfenikol fjerner vekst av bakterier. Dersom en har fortsatt har problemer med bakteriell overvekst, kan ytterligere tilsats av gentamicin eller ciprofloxacin forsøkes.

C - Cycloheximid fjerner hurtigvoksende muggsopp, men kan hemme aktuelle non-dermatofytt arter. Hemmer ikke *C.albicans*. Medium uten cycloheximid bør benyttes dersom non-dermatofytt mistenkes. Enkelte Microsporium arter kan også hemmes.

Malassezia spp. krever lipid substrat for vekst, f.eks olivenolje på Sabouraud.

Direkte mikroskopi

Det er bred enighet om anbefalingen av mikroskopi utført direkte på prøvematerialet, da dyrkning alene har lav sensitivitet. Lav sensitivitet kan skyldes få viable soppelementer i prøvematerialet eller at lesjonen har kun et lite område med viable soppelementer, som vanskeliggjør prøvetaking. KOH behandlet prøvematerialet undersøkes med fasekontrast på 400X forstørrelse, alternativt fluorescensmikroskopi med Calcofluor-White. Mikroskopi krever erfaring [3, 13, 17, 18]

Av 8 laboratorier som responderte utfører 1 mikroskopi på alle prøver med tilstrekkelig materiale og ett 1 oppfordring.

Tabell 5 - St. Olavs Hospital - Resultat mikroskopi 2012

Prøvemateriale	Mottatt	Mikroskopert	Sopp påvist (%)
Hår	2	2	0 (-)
Negler	1038	1010	448 (44%)
Hud	841	487	202 (41%)

Svensk referensmetodik[17] henviser til en ikke-referert studie hvor 5 % av mikroskopi-negative prøver var dyrknings-positive, mens 31 % av mikroskopi-positive var dyrknings-negative (hovedsakelig negleprøver).

Morfologi ved direkte mikroskopi kan i noen tilfeller gi mistanke om agens, men dyrkning og/eller molekylære metoder er som regel påkrevd for sikker artsidentifikasjon.

Utfordring er å få rekvirentene til å sende nok prøvematerialet for både mikroskopi og dyrking.

Direkte PCR

Dyrkning og direkte mikroskopi har i beste fall en sensitivitet 70-80 %, i mange tilfeller vesentlig lavere. PCR-baserte teknikker utført direkte på prøvematerialet har stort potensialet for mere sensitiv og raskere diagnostikk.[19, 20]

Agensspesifikk, «pan-dermatofytt» eller «pan-sopp»-metode har alle svakheter utfra hvilke arter de kan påvise og om påvist art utgjør infeksjon, sekundær kolonisering eller kontaminering.

Påvisning av patogen art som passer med klinisk problemstilling, f.eks *T.rubrum* ved onychomykose, bør kunne utelukke ytterligere diagnostikk. En stor del av prøvene kan sannsynligvis håndteres på denne måten.

Identifisering

Fenotypisk identifisering

Fenotypisk identifisering krever erfaring. Makroskopisk vurdering utseende inkl. stereomikroskopisk undersøkelse av koloniutseende, farge over og under agar. Mikroskopisk bilde, gjerne teip-bomullblått preparat hvor form, størrelse, anordning av makro og mikrokonidier, klamydosporer, hyfeformer vurderes. Dette sammenholdes med et godt oppslagsverk. Svensk referensmetodik har angitt en liste over anbefalte oppslagsverk[17]. Pass på at en sammenligner bilder og egen vekst fra samme type vekstmedium.

En rekke differensialtester eksisterer, hvor de fleste er tidkrevende, opptil flere uker. Se tabell for noen av de vanligste. Kun bruksområde for dermatofytter er angitt.

Tabell 6 – Fenotypiske identifiseringsmetoder

Test	Beskrivelse
Cornmeal agar m 1 % dextrose	Skiller <i>T.rubrum</i> (rødt pigment) fra <i>T.mentagrophytes</i> , pigmentdannelse.
Potet-dextrose agar	<i>T.rubrum</i> pigmentering. Vekst for kolonimikroskopi
Polert ris medium	<i>M.andouii</i> vokser dårlig, skilles fra <i>M.canis</i> .
Trichophyton agarer 1-7	Differensiering av <i>Trichophyton spp.</i>
Urea agar/buljong	Nedbryting av urea. Skiller <i>T.rubrum</i> fra <i>T.mentagrophytes</i>
In vitro hårperforasjonstest	Vekstmønster ved mikroskopi. Differensierer enkelte <i>Microsporum spp.</i> og <i>Trichophyton spp.</i>
BromCreosolPurple(BCP) medium	Skiller <i>T.rubrum</i> , <i>T.mentagrophytes</i> , <i>M.persicolor</i> . Vekst mønster og pH-ending.
Temperaturløselighet	Differensiering av <i>Trichophyton spp.</i> , <i>M. ferrugineum</i>

Kliniske opplysninger om lesjonens utseende og lokalisasjon, reiseanamnese kan og være av betydning. Enkelte non-dermatofyttinfeksjoner har spesiell farge.

MALDI-TOF

Relativt ny teknologi. Mindre avhengig av erfaring hos operatør enn tradisjonelle fenotypiske metoder. Rask metode(timer) og kan ofte gjøres på kultur fra skål, alternativt fra buljonginkubering Kommer bedre ut enn konvensjonelle metoder i de fleste publikasjoner, og det er lite feilidentifikasjon sammenlignet med sekvensbasert identifisering.[21, 22] Kommersiell artsbibliotek som inneholder relevante arter finnes både for Bruker og VitekMS. Vil sannsynligvis kunne erstatte vanlige fenotypiske metoder i de fleste tilfeller.

Molekylære teknikker.

Målområder i ulike deler av DNA kan benyttes for identifisering. Sekvensering av ITS regionen er gullstandard.

Spørsmål til møtet

Er dyrking alene godt nok?

Kan dyrkning droppes ved innføring av PCR?

Kan mikroskopi droppes ved innføring av PCR?

Hva ansees som rimelig svartid ved innsending av stamme til referanselaboratorium?

Referanser:

1. Graser, Y., J. Scott, and R. Summerbell, *The new species concept in dermatophytes-a polyphasic approach*. Mycopathologia, 2008. **166**(5-6): p. 239-56.
2. Weitzman, I. and R.C. Summerbell, *The dermatophytes*. Clin Microbiol Rev, 1995. **8**(2): p. 240-59.
3. Versalovic, J., et al., *Manual of clinical microbiology*. 10th ed, ed. J. Versalovic. 2011, Washington, DC: ASM Press. 2 b.
4. Dolin, R., et al., *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 2010, Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier.
5. Ameen, M., *Epidemiology of superficial fungal infections*. Clin Dermatol, 2010. **28**(2): p. 197-201.
6. Petrini, B., *Treatment of dermatomycoses - epidemiology and transmission*. Information från Läkemiddelsverket, 2004. **15**(6).
7. Sandven, P. and O. Bruland, [*Occurrence of tinea pedis in military recruits*]. Tidsskr Nor Laegeforen, 1984. **104**(23): p. 1526-7.
8. Degré, M., et al., *Medisinsk mikrobiologi*. 2008, Oslo: Gyldendal. 803 s. : ill.
9. Fyrand, O., P. Hjortdahl, and O. Fyrand, *Hudsykdommer: diagnose, pleie og behandling*. 2007, Oslo: Gyldendal akademisk. 327 s. : ill.
10. Anaissie, E.J., M.R. McGinnis, and M.A. Pfaller, *Clinical mycology*. 2009: Churchill Livingstone. xii, 688 s. : ill.
11. Moreno, G. and R. Arenas, *Other fungi causing onychomycosis*. Clin Dermatol, 2010. **28**(2): p. 160-3.
12. Gupta, A.K., et al., *Systematic review of nondermatophyte mold onychomycosis: diagnosis, clinical types, epidemiology, and treatment*. J Am Acad Dermatol, 2012. **66**(3): p. 494-502.
13. *B 39 - Investigation of Dermatological Specimens for Superficial Mycoses*. 2013; Available from: http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317132858351
14. Summerbell, R.C., et al., *Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes*. Med Mycol, 2005. **43**(1): p. 39-59.
15. Ramos, E.S.M., et al., *Superficial mycoses in immunodepressed patients (AIDS)*. Clin Dermatol, 2010. **28**(2): p. 217-25.
16. Allevato, M.A., *Diseases mimicking onychomycosis*. Clin Dermatol, 2010. **28**(2): p. 164-77.
17. Edebo, L., B. Petrini, and H. Hallander. *Referensmetodik: Svampinfeksjoner*. 2009 [cited 2013 15.10.13]; Available from: <http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Referensmetodik:Svampinfeksjoner>
18. *Konsensusmøte nr 4, 1990: Mykologi*, P. Sandven and J. Lassen, Editors. 1990, Statens institutt for folkehelse, Avdeling for bakteriologi: Oslo. p. book.
19. Uchida, T., et al., *Comparative study of direct polymerase chain reaction, microscopic examination and culture-based morphological methods for detection and identification of dermatophytes in nail and skin samples*. J Dermatol, 2009. **36**(4): p. 202-8.
20. Bergmans, A.M., et al., *Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material*. Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(6): p. 704-10.
21. Nenoff, P., et al., *MALDI-TOF mass spectrometry - a rapid method for the identification of dermatophyte species*. Med Mycol, 2013. **51**(1): p. 17-24.
22. Clark, A.E., et al., *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology*. Clin Microbiol Rev, 2013. **26**(3): p. 547-603.

2.17 Nasjonalt referanselaboratorium for medisinsk mykologi

Cecilie Torp Andersen, Mikrobiologisk avdeling, OUS Rikshospitalet

Nasjonalt referanselaboratorium for medisinsk mykologi (NRMM) har ansvar for identifikasjon og resistensbestemmelse av invasive soppisolat, med særskilt ansvar for oppfølging og overvåking av invasive Candida infeksjoner. Ny nettside www.mycologi.no er under oppbygging.

NRMM er en del av HelseSørØst sitt regionale nettverk "Invasive fungal infections: epidemiology, resistance mechanisms and host-pathogen interactions".

Analysert utføres ved:

Sopplaboratoriet, Bakteriologisk seksjon, Rikshospitalet

(Referanseundersøkelse soppdyrkning og resistensbestemmelse, Dermatofytt-PCR tlf: 23 07 31 15 sekvensering/PCR- og antigenundersøkelser)

Bakteriologisk seksjon, Rikshospitalet, Prøvemottak

(Resultater av soppdyrkning og resistensbestemmelse, sekvensering/PCR- og antigenundersøkelser) tlf: 22 07 11 25

Enhet for Virologi og infeksjonsimmunologi, Rikshospitalet

(resultater galaktomanan undersøkelser) tlf: 23 07 10 99

Kontaktpersoner for Nasjonalt referanselaboratorium for mykologi:

Fagansvarlig overlege Cecilie Torp Andersen e-post: cecilie.torp.andersen@ous-hf.no

Fagansvarlig bioingeniør: Aina Myhre e-post: aina.myhre@ous-hf.no

Forskningsansvarlig: Professor Peter Gaustad e-post: peter.gaustad@ous-hf.no

Våre hovedoppgaver:

Bistå primærlaboratorier med identifikasjon og resistensbestemmelse av alle Candidaisolat fra blodkultur, og å forvalte nasjonal stammebank for invasive Candidaisolat.

Nasjonal overvåking av Candidaresistens

Bistå primærlaboratorier med identifikasjon og resistensbestemmelse av andre kliniske soppisolat.

Soppserologi og antigenpåvisning

Utvikling og utprøving av analyser for diagnostikk, og oppfølging av soppinfeksjoner i samarbeid med utviklingsseksjonen.

Arbeidet utføres i samarbeid med bakteriologisk seksjon og enhet for virologi og infeksjonsimmunologi. Dessuten har vi samarbeid med Seksjon for klinisk farmakologi, enheten på Rikshospitalet utfører serumkonsentrasjonsmålinger av antimykotika.

Oversikt over aktuelle undersøkelser, utførende seksjon og lenker til aktuelle rekvisisjoner:

Nasjonalt referanselaboratorium for medisinsk mykologi (NRMM) (sopplabben)

- Isolat til identifikasjon og eventuell resistensbestemmelse fra primærlaboratoriene
 - All gjærsopp i blodkultur til endelig identifikasjon og resistensbestemmelse
 - Alle andre invasive isolat for identifikasjon og resistensbestemmelse
 - Identifikasjon og på forespørsel resistensbestemmelse av muggsoppisolat
 - Identifikasjon av dermatofytter

[Rekvisisjon for Identifikasjon og resistensbestemmelse av soppisolater.pdf](#)

Avdeling for mikrobiologi, Seksjon for bakteriologi.

- 18s /ITS DNA-påvisning og sekvensering direkte i prøvematerialet,
- Aspergillus PCR,
- Pneumocystis PCR og immunfluorescensmikroskopi,
- Mikroskopi mtp sopp (Calcofluorwhite evt KOH)
- Vanlig soppdyrkning og eventuell resistensbestemmelse i primærprøve
- Dermatofytt PCR og dermatofytt dyrkning

[Rekvisisjon for bakterie-, sopp- og parasittanalyser - MIK Rikshospitalet \(pdf\)](#)

Analyser ved enhet for virologi og infeksjonsimmunologi, Rikshospitalet (VIM)

- Galaktomannan (Aspergillusantigen),
- Kryptokokkantigen,
- Aspergillus presipiterende antistoff og fugleantistoff
- Antistoff mot dimorf sopp: Prøvene rekvireres på remissen til og sendes dit.

[Rekvisisjon for virus og serologiske undersøkelser \(RH\)](#)

Vi samarbeider med:

Seksjon for klinisk farmakologi, enhet Rikshospitalet

Kontakttelefon: 23071014 (laboratoriet)

- Enheten utfører serumkonsentrasjonsmålinger av antimykotika. (vorikonazol, posakonazol og itraconazol)

Lenke til nettsiden <http://anx.no/analyseoversikt/>

Hva ønsker vi å tilby?:

Utvidet diagnostikk:

1,3- β -D-glukan

Zygomycetes PCR

Mannan og anti-mannan

Fortsatt utviklingsarbeid med MALDI-TOF blant annet for identifikasjon av filamentøse sopp inklusiv dermatofytter.

Nye metoder for resistensbestemmelse

Innføre EUCAST buljongfortynning som referansem metode

Påvisning av resistensgener hos sopp

Hva ønsker vi fra primærlaboratoriene?:

Vi ønsker også å få tilsendt gjentatte candidaisolat under pågående behandling (>7dager) for å se på resistensutvikling og å få tilsendt alle muggsoppisolat med antatt klinisk betydning, inklusiv isolat fra ikke-sterile områder hos risikopasienter.

Utgitt av Folkehelseinstituttet
Smittevern, miljø og helse
Desember 2015

Rapporten kan lastes ned som pdf:
www.fhi.no/publikasjoner

ISSN: 0804-8444
ISBN: 978-82-8082-703-6 trykt utgave
ISBN: 978-82-8082-702-9 elektronisk utgave
Opplag: 80