

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

**Rapport fra strategimøte**

**Hovedredaktører: Jørgen Lassen og Per Sandven**

Strategimøte nr 17, 2003

# **Nedre luftveisinfeksjoner**

## **Spesielle kliniske og diagnostiske problemer**

Redaktører:

**Pål A Jenum, Tone Skarpaas, Olav B Natås**



# INNHALDSFORTEGNELSE

<b>1</b>	<b>OPPSUMMERING OG ANBEFALINGER</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>MYCOPLASMA PNEUMONIAE, CHLAMYDIA PNEUMONIAE, BORDETELLA PERTUSSIS</b>	<b>11</b>
1.1.1	INDIKASJON FOR <i>MIKROBIOLOGISK</i> UNDERSØKELSE	11
1.1.2	UNDERSØKELSER	11
1.1.3	PRØVETAKING OG FORSENDELSE TIL PÅVISNING AV SMITTESTOFF	11
1.1.4	VALG AV ANALYSER	12
1.1.5	TOLKNING	12
<b>1.2</b>	<b>LEGIONELLA</b>	<b>15</b>
1.2.1	LEGIONELLOSE	15
<b>1.3</b>	<b>ATYPISKE MYKOBAKTERIER</b>	<b>16</b>
1.3.1	INDIKASJON FOR UNDERSØKELSE	16
1.3.2	PRØVEMATERIALE	16
1.3.3	ANALYSER	16
1.3.4	TOLKNING	16
1.3.5	BEHANDLING	17
<b>1.4</b>	<b>PNEUMOCYSTIS</b>	<b>17</b>
1.4.1	KLASSIFIKASJON	17
1.4.2	INDIKASJON FOR UNDERSØKELSE	17
1.4.3	PRØVEMATERIALE	17
1.4.4	ANALYSER	17
<b>1.5</b>	<b>CYSTISK FIBROSE</b>	<b>18</b>
1.5.1	VIKTIGSTE LUFTVEISPATHOGENER	18
1.5.2	INDIKASJON FOR UNDERSØKELSE	18
1.5.3	PRØVEMATERIALE	18
1.5.4	ANALYSER	18
<b>2</b>	<b>SAMMENDRAG AV INNLEGGENE</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>MYCOPLASMA PNEUMONIAE – AGENSPÅVISNING</b>	<b>20</b>
2.1.1	INNLEDNING	20
2.1.2	PRØVETAKING	20
2.1.3	DIAGNOSTIKK	21
2.1.4	KONKLUSJON	22
2.1.5	LITTERATUR	22
<b>2.2</b>	<b>MYCOPLASMA PNEUMONIAE – ANTISTOFFPÅVISNING</b>	<b>23</b>
2.2.1	INNLEDNING	23
2.2.2	DIAGNOSTIKK	23
2.2.3	BEHANDLING	24
2.2.4	OPPSUMMERING	24
2.2.5	LITTERATUR	24
<b>2.3</b>	<b>CHLAMYDIA PNEUMONIAE - AGENSPÅVISNING</b>	<b>27</b>
2.3.1	INNLEDNING	27
2.3.2	SYKDOMMER	27
2.3.3	INDIKASJONER	27
2.3.4	PRØVEMATERIALE	28
2.3.5	VALG AV METODE	29
2.3.6	SAMMENDRAG	30
2.3.7	LITTERATUR	30
<b>2.4</b>	<b>CHLAMYDIA PNEUMONIAE - ANTISTOFFPÅVISNING</b>	<b>32</b>
2.4.1	INNLEDNING	32

2.4.2	KOMPLEMENTBINDINGSREAKSJON (KBR)	33
2.4.3	MIKROIMMUNOFLUORESCENS	34
2.4.4	EIA	35
2.4.5	KONKLUSJONER	36
2.4.6	LITTERATUR	36
<b>2.5</b>	<b>KIKHOSTE - AGENSPÅVISNING</b>	<b>38</b>
2.5.1	INNLEDNING	38
2.5.2	INDIKASJON FOR AGENSPÅVISNING	38
2.5.3	PRØVETAKING	39
2.5.4	DYRKNING	39
2.5.5	IDENTIFISERING	40
2.5.6	PCR	40
2.5.7	DYRKNING VERSUS PCR	41
2.5.8	ANBEFALINGER	41
2.5.9	LITTERATUR	41
<b>2.6</b>	<b>KIKHOSTE - ANTISTOFFPÅVISNING</b>	<b>42</b>
2.6.1	INNLEDNING	42
2.6.2	INDIKASJON FOR ANTISTOFFPÅVISNING	42
2.6.3	PRØVETAKING	42
2.6.4	VALG AV TESTER	43
2.6.5	OPPSUMMERING	46
2.6.6	LITTERATUR	46
<b>2.7</b>	<b>LEGIONELLA - AGENSPÅVISNING</b>	<b>47</b>
2.7.1	INNLEDNING	47
2.7.2	DIAGNOSTIKK	48
2.7.3	BRUK AV TESTER I RUTINEDIAGNOSTIKKEN	49
2.7.4	MILJØPRØVER	50
2.7.5	LITTERATUR	50
<b>2.8</b>	<b>LEGIONELLA – ANTISTOFFPÅVISNING</b>	<b>52</b>
2.8.1	DIAGNOSTISKE KRITERIER	52
2.8.2	VALG AV ANTIGEN	52
2.8.3	ANTISTOFFRESPONS	52
2.8.4	VYER	53
<b>2.9</b>	<b>ATYPISKE MYKOBAKTERIER</b>	<b>54</b>
2.9.1	INNLEDNING	54
2.9.2	FREMMARSJEN AV ATYPISKE MYKOBAKTERIER: NYE ARTER OPPDAGES	54
2.9.3	MOLEKYLÆR MYKOBACTERIEDIAGNOSTIKK	54
2.9.4	BYRDEN AV UIDENTIFISERBARE MYKOBACTERIEARTER I LABORATORIENE	57
2.9.5	IKKE-TUBERKULØS MYKOBACTERIELL LUNGEINFEKSJON VED CYSTISK FIBROSE	57
2.9.6	PREDISPOSISJON OVERFOR MYKOBACTERIEINFEKSJONER: BETYDNINGEN AV VERTENS GENETISKE PROFIL	57
2.9.7	ATYPISKE MYKOBACTERIER SOM ÅRSÅK TIL TENTATIV NEDRE LUFTVEISINFEKSJON – NÅR SKAL MAN LETE SPESIFIKT ETTER ATYPISKE MYKOBACTERIER?	58
2.9.8	PRØVETAKING VED MISTANKE OM LUFTVEISINFEKSJON MED ATYPISKE MYKOBACTERIER	58
2.9.9	OPPFØLGING AV POSITIVE FUNN: NÅR OG HVORDAN?	58
2.9.10	ATYPISKE MYKOBACTERIER SOM ”BIFUNN” VED DYRKNING MED HENSYN PÅ <i>M. TUBERCULOSIS</i> – HVA BETYR ET POSITIVT FUNN?	58
2.9.11	IDENTIFIKASJON AV ATYPISKE MYKOBACTERIER	59
2.9.12	HVILKEN PLESS HAR RESISTENSBESTEMMELSE?	59
2.9.13	BEHANDLING AV INFEKSJONER MED ATYPISKE MYKOBACTERIER	59
2.9.14	KONKLUSJON	59
2.9.15	LITTERATUR	60
<b>2.10</b>	<b>PNEUMOCYSTIS</b>	<b>61</b>
2.10.1	HISTORISK PERSPEKTIV	61
2.10.2	<i>PNEUMOCYSTIS</i> : NY NOMENKLATUR	61

2.10.3	MORFOLOGI OG LIVSSYKLUS	62
2.10.4	KLINIKK	62
2.10.5	DIAGNOSTIKK	63
2.10.6	SAMMENDRAG	65
2.10.7	LITTERATUR	65
<b>2.11</b>	<b>CYSTISK FIBROSE</b>	<b>66</b>
2.11.1	STRATEGI FOR DYRKNING OG RESISTENSBESTEMMELSE	66
2.11.2	INNLEDNING	66
2.11.3	INDIKASJON FOR PRØVETAKING	66
2.11.4	PRØVEMATERIALE	66
2.11.5	MIKROSKOPI AV EKSPEKTORAT	66
2.11.6	DYRKNINGSMEDIER – ATMOSFÆRE – DYRKNINGSTID	66
2.11.7	PSEUDOMONAS AERUGINOSA	67
2.11.8	BURKHOLDERIA CEPACIA KOMPLEKSET	67
2.11.9	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	68
2.11.10	HAEMOPHILUS INFLUENZAE	68
2.11.11	PNEUMOKOKKER	68
2.11.12	RESISTENSBESTEMMELSE AV CF BAKTERIESTAMMER	69



## **Forord**

Referansegruppen for eksterne kvalitetsvurderinger i bakteriologi, mykologi og parasittologi arrangerte 07.11.03 det 17. strategimøtet ved Nasjonalt folkehelseinstitutt. Møtet omhandlet "*Nedre luftveisinfeksjoner. Spesielle kliniske og diagnostiske problemer*".

Ansvarlig programkomité har vært Pål A. Jenum, Tone Skarpaas og Olav B. Natås. Som vanlig har den samme gruppen hatt det redaksjonelle ansvaret for møtets avsluttende rapport som hermed presenteres. Rapporten er som vanlig inndelt i henholdsvis en innledende, oppsummerende del og en del hvor de enkelte innleggene under møtet er sammenfattet. Den første, oppsummerende delen er ført i pennen av redaksjonskomitéen, mens ansvaret for innleggene i del to i sin helhet er overlatt til de enkelte innleiderne. Denne delen faller dermed i alt vesentlig utenfor redaktørenes ansvarsområde.

Vi håper at nærværende rapport vil vise seg å bli like nyttig som de øvrige rapportene i denne serien vanligvis har vist seg å være.

*Oslo, mars 2004*

*For Referansegruppen*

*Jørgen Lassen*

*Per Sandven*





## PROGRAM FOR MØTET

Mycoplasma pneumoniae – agenspåvisning	Svein Arne Nordbø
Mycoplasma pneumoniae – antistoffpåvisning	Tore J. Gutteberg
Chlamydia pneumoniae – agenspåvisning	Dag Hvidsten
Chlamydia pneumoniae – antistoffpåvisning	Peter A. Csángó
Kikhoste – agenspåvisning	Turid Mannsåker
Kikhoste – antistoffpåvisning	Pål A. Jenum
Legionella – agenspåvisning	Olav B. Natås
Legionella – antistoffpåvisning	Bjørn P. Berdal
Atypiske mycobakterier	Tone Tønjum
Pneumocystis	Peter Gaustad
Cystisk fibrose	Nils O. Hermansen

## DELTAKEROVERSIKT

Bjørn Berdal  
Forsvarets mikrobiologiske  
laboratorium  
0401 Oslo

Anne-Lise Bruu  
Mikrobiologisk laboratorium  
Sykehuset i Vestfold HF  
3117 Tønsberg

Peter Csango  
Mikrobiologisk avdeling  
Sørlandet sykehus HF  
4604 Kristiansand S

Asbjørn Digranes  
Avd. for mikrobiologi og  
immunologi  
Helse Bergen HF, Haukeland  
Sykehus  
5021 Bergen

Peter Gaustad  
Mikrobiologisk institutt  
Rikshospitalet HF  
0027 Oslo

Tore Gutteberg  
Mikrobiologisk avdeling  
Universitetssykehuset i Nord-  
Norge HF  
9019 Tromsø

Elisabet Haarr  
Mikrobiologisk laboratorium  
Helse Stavanger HF  
4011 Stavanger

Hanne Husom Haukland  
Mikrobiologisk avdeling  
Universitetssykehuset i Nord-  
Norge HF  
9019 Tromsø

Nils Olav Hermansen  
Mikrobiologisk avdeling  
Ullevål universitetssykehus HF  
0407 Oslo

Reidar Hjetland  
Mikrobiologisk avdeling  
Helse Førde HF, Sentralsjukehuset  
6800 Førde

Berit Hovig  
Mikrobiologisk avdeling  
Laboratorium for klinisk  
mikrobiologi A/S  
0165 Oslo

Dag Hvidsten  
Mikrobiologisk avdeling  
Universitetssykehuset i Nord-  
Norge HF  
9038 Tromsø

Hjørdis Iveland  
Mikrobiologisk avdeling  
Sykehuset Buskerud HF  
3004 Drammen

Pål A. Jenum  
Mikrobiologisk seksjon,  
Sentrallaboratoriet  
Sykehuset Asker og Bærum HF  
1306 Bærum postterminal

Turid Mannsåker  
Divisjon for smittevern  
Nasjonalt folkehelseinstitutt  
0401 Oslo

Arne Mehl  
Mikrobiologisk avdeling  
Helse Nord Trøndelag HF  
7600 Levanger

Liisa Mortensen  
Mikrobiologisk avdeling  
Nordlandssykehuset HF  
8092 Bodø

Fredrik Müller  
Mikrobiologisk institutt  
Rikshospitalet HF  
0027 Oslo

Sølvi Noraas  
Mikrobiologisk avdeling  
Sørlandet sykehus HF  
4604 Kristiansand S

Olav Natås  
Mikrobiologisk laboratorium  
Helse Stavanger HF  
4011 Stavanger

Svein A. Nordbø  
Mikrobiologisk avdeling  
St Olavs Hospital HF  
7030 Trondheim

Eivind Ragnhildstveit  
Mikrobiologisk avdeling  
Sykehuset Østfold HF, Fredrikstad  
1603 Fredrikstad

Signe Holta Ringertz  
Mikrobiologisk avdeling  
Aker universitetssykehus HF  
0514 oslo

Per Sandven  
Mikrobiologisk institutt  
Rikshospitalet HF  
0027 Oslo

Tone Skarpaas  
Mikrobiologisk avdeling  
Sørlandet sykehus HF  
4604 Kristiansand S

Martin Steinbakk  
Mikrobiologisk avdeling  
Akershus Universitetssykehus HF  
1474 Nordbyhagen

Yngvar Tveten  
Telelab as  
P.b. 1868 Gulset,  
3703 Skien

Tine Tønjum  
Mikrobiologisk institutt  
Rikshospitalet HF  
0027 Oslo

Einar Vik  
Mikrobiologisk laboratorium  
Helse Nordmøre og Romsdal HF,  
Molde  
6400 Molde

Einar Aandahl  
Avdeling for mikrobiologi  
Sykehuset Innlandet HF  
Lillehammer  
2629 Lillehammer

# 1 OPPSUMMERING OG ANBEFALINGER

## 1.1 *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bordetella pertussis*

### 1.1.1 Indikasjon for *mikrobiologisk* undersøkelse

- Behandlingstrengende hoste
  - Pneumoni
  - I epidemisk situasjon: Mindre krav til indikasjon
- Opplysning om varighet av symptomer er avgjørende for å kunne tolke analyseresultatet.

### 1.1.2 Undersøkelser

Valg av analyser

Smittestoff	< 2 uker	2-4 uker	> 4 uker
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Nukleinsyre påvisning Serum: "0-prøve"	Nukleinsyre påvisning Antistoff	Antistoff
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Nukleinsyre påvisning Serum: "0-prøve"	Nukleinsyre påvisning Antistoff	Antistoff
<i>Bordetella pertussis</i>	Nukleinsyre påvisning Dyrkning Serum: "0-prøve"	Nukleinsyre påvisning (Dyrkning) Antistoff	Antistoff <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hos barn <1år kan immunresponsen ved kikhoste komme etter mange uker

Man kan vente med å undersøke 0-prøve til oppfølgingsprøve forligger.  
Ved påvist smittestoff i primærprøve er serumkontrollprøve tatt senere ikke nødvendig.

### 1.1.3 Prøvetaking og forsendelse til påvisning av smittestoff

Aktuelle agens er celleassosiert. Det er derfor viktig at prøvematerialet inneholder rikelig med epitelceller.

Materiale	Undersøkelsesmetode	Prøvetaking
Nasopharynx sekret	Dyrkning (Kun <i>B.pertussis</i> )  Nukleinsyre påvisning	<ul style="list-style-type: none"><li>• Aspirat- eller penselprøve</li></ul> Dakron- eller calsiumalginat pensel i adekvat transportmedium <sup>1</sup> <ul style="list-style-type: none"><li>• Dakronpensel i transportmedium</li></ul>
Halsprøve	Nukleinsyre påvisning	Dakronpensel i transportmedium
Materiale fra nedre luftveier (BAL)	Nukleinsyre påvisning <sup>2</sup>	

<sup>1</sup> Barn innlagt i sykehus med klinisk mistanke om kikhoste bør undersøkes med både dyrkning, PCR og antistoffundersøkelse. Hos sykehusinnlagte barn bør man derfor ta nasopharynxprøve (dakronpensel).

<sup>2</sup> Materialet lite aktuelt ved *B. pertussis* untatt hos immunsupprimerte

## 1.1.4 Valg av analyser

### 1.1.4.1 Dyrkning

Dyrkning er i vanlig rutine kun aktuelt for *B. pertussis*, ikke for *C. pneumoniae* eller *M. pneumoniae*. Aktuelt forslag til selektivt kikhostemedium: CHB-medium (charcoal-horse-blood, Oxoid, også under navnet Regan-Lowe-medium) med cefalexin. Eventuelt også CHB uten cefalexin i tillegg.

### 1.1.4.2 Nukleinsyrepåvisning

For valg av gensekvenser med tilhørende primere, eventuelt prober og øvrige analysebetingelser, henvises til referanselistene og annen spesiallitteratur.

### 1.1.4.3 Antistoffpåvisning

*M. pneumoniae*: Ulike metoder er i bruk. Ingen sikker konklusjon om hvilke(n) som bør anbefales. Presentasjonen viste at Savyon synes gi uforholdsmessig mange positive. Laboratorier som benytter KBR bør samordne diagnostisk beslutningsgrenser for angivelse av aktuell sykdom (stor variasjon i andel positive).

*C. pneumoniae*: Blant EIA tester angir litteraturen at SeroCP og Quant for IgG synes ha den beste kombinasjon av sensitivitet og spesifisitet.

*B. pertussis*: Det bør benyttes test som baseres på spesifikke antigener, minimum pertussistoksin (PT). PT-IgG er den enkelttesten som gir best diagnostisk utbytte. Bruk av PT-IgA, FHA-IgG og -IgA kan gi tilleggsopplysninger. Diagnostiske beslutningsgrenser for aktuell infeksjon bør kvalitetssikres.

## 1.1.5 Tolkning

### 1.1.5.1 Generelt

Diagnostisk gullstandard for påvisning av disse spesifikke infeksjonene finnes ikke. Nærmest gullstandard kommer man ved å sammenholde kliniske, epidemiologiske data med resultatene fra påvisning av smittestoff og spesifikke antistoff. Relasjonen til tid fra sykdomsdebut til prøvetaking er viktig.

### 1.1.5.2 Tolkning av agenspåvisning

Analytisk sett fremstår nukleinsyrepåvisning som gullstandard for smittestoffpåvisning. Mulighet for friske bærere bør angis i svaret

Smittestoff	Sensitivitet	Bærerskap
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Nukleinsyrepåvisning god	Forekommer Barn: 4,6-13,5% <sup>1</sup>
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Nukleinsyrepåvisning god	Forekommer Barn: 1,4-16,7% <sup>1</sup>
<i>Bordetella pertussis</i>	Nukleinsyrepåvisning god Dyrkning mindre sensitiv	Nei

<sup>1</sup> Principi N, Esposito S: Emerging role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in pediatric respiratory tract infections. Review. Lancet Infect Dis 2001;1:334-43.

### 1.1.5.3 Tolkning av antistoffundersøkelse

Smittestoff	Metode	Taler for aktuell infeksjon
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	EIA IgM, IgG  KBR	<b>Serumpar</b> med ca 2 ukers intervall <sup>1</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>Serokonversjon eller signifikant stigning i antistoffnivå<sup>2</sup>.</li> <li>Primærinfeksjon: <ul style="list-style-type: none"> <li>IgM påvist (NB: kan persistere) og IgG påvises etter 2 uker.</li> </ul> </li> </ul> <b>Enkeltserum</b> >2-3 uker etter sykdomsdebut <ul style="list-style-type: none"> <li>IgG høyt nivå<sup>3</sup></li> <li>Primærinfeksjon: <ul style="list-style-type: none"> <li>IgM påvist (NB: kan persistere) og IgG høyt nivå<sup>3</sup></li> </ul> </li> <li>4x titerstigning</li> <li>Høyt titer <math>\geq 64</math></li> </ul>
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	MIF (gullstandard) IgM, IgG EIA IgM, IgG	<b>Serumpar</b> med ca 2 ukers intervall <sup>1</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>Serokonversjon eller signifikant stigning i antistoffnivå<sup>2</sup></li> <li>Primærinfeksjon: <ul style="list-style-type: none"> <li>IgM påvist (NB: Ikke sikkert da IgM kan persistere lenge)</li> </ul> </li> </ul> <b>Enkeltserum</b> >2-3 uker etter sykdomsdebut <ul style="list-style-type: none"> <li>IgG høyt nivå<sup>3</sup></li> </ul>
<i>Bordetella pertussis</i> <sup>4</sup>	EIA PT-IgG, IgA FHA-IgG, IgA	<b>Serumpar</b> med ca 2 ukers intervall <sup>1</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>Serokonversjon eller signifikant stigning i PT-IgG<sup>2</sup></li> <li>&gt;60 år: Serokonversjon eller signifikant stigning i FHA-IgG<sup>2</sup></li> </ul> <b>Enkeltserum</b> >2-3 uker etter sykdomsdebut (se vedlegg) <ul style="list-style-type: none"> <li>PT-IgG høyt nivå og PT-IgA positiv</li> <li>PT-IgG og FHA-IgG og FHA-IgA høyt nivå</li> <li>PT-IgG høyt nivå</li> </ul>

<sup>1</sup> Kontrollprøve gir ikke tilleggsmåling dersom første prøve er tatt  $\geq 4$  uker etter sykdomsdebut

<sup>2</sup> For å kunne bedømme stigning i antistoffnivå ved EIA må begge prøver undersøkes i samme oppsett og kunnskap om testens usikkerhet bør foreligge

<sup>3</sup> > mean OD + 3 standardavvik ved analyse av frisk befolkning (blodgivere). Må likevel tolkes med varsomhet.

<sup>4</sup> Ved tolkning av *B. pertussis* antistoffundersøkelse må resultatet vurderes i forhold til pasientens alder og vaksinasjonsstatus. I Norge benyttes acellulær komponentvaksine med pertussistoxoid (PT), filamentøst hemagglutinin (FHA) og pertactin. Etter minst to doser kan de sees utslag i PT- og FHA-IgG.

Funn av IgG alene i enkeltprøve må tolkes med varsomhet!  
Mikroimmunfluorescens (MIF) er definert som gullstandard for antistoffbestemmelse mot *C. pneumoniae*. Likevel knytter det seg problemer til MIF, f.eks. ved bruk av antigener med ulike spesifisiteter.  
Standardsera for *B. pertussis* antistoff er under utarbeiding.  
Man bør i resultatvurderingen skille mellom ”sikker aktuell” og ”mulig aktuell” infeksjon.

#### 1.1.5.4 Hvem kan gjøre analysene?

Laboratorier som utfører diagnostisk mikrobiologi bør arbeide for å innføre genbaserte amplifikasjonsmetoder for påvisning av *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* og *B. pertussis*. Antistoffundersøkelser for disse agens bør også utføres.

#### 1.1.5.5 Referansefunksjoner

***M. pneumoniae* og *C. pneumoniae* dyrkning.** Ingen utfører dette rutinemessig i Norge nå. Det ble ikke uttrykt behov for at nasjonal referansefunksjon burde etableres.

***M. pneumoniae* antistoff.** I mangel av gullstandard eller anbefalt metode er det lite grunnlag for nasjonal referansefunksjon.

***C. pneumoniae* antistoff.** MIF er gullstandard. Ingen utfører denne krevende testen rutinemessig nå. Ønske om nasjonal referansefunksjon ble fremsatt. Ingen ønsker å påta seg denne oppgaven nå. Behovet anses lite.

***B. pertussis* dyrkning.** I diagnostisk sammenheng vil behovet for dyrkning avta i fremtiden. Isolater har imidlertid betydning for epidemiologisk og resistensmessig overvåkning, spesielt i vaksinesammenheng. Folkehelseinstituttet har landsfunksjon med tanke på disse forhold. Isolerte stammer bør sendes FHI.

***B. pertussis* antistoff.** I mangel av gullstandard eller anbefalt metode er det lite grunnlag for nasjonal referansefunksjon.

## 1.2 Legionella

### 1.2.1 Legionellose

#### Analyser for påvisning

<u>SMITTE-STOFF PÅVISNING</u>	Materiale	Metode	Kommentarer / videre analyser
<b>Antigen</b> <sup>1</sup>	Urin Luftveissekret	Immunkromatografisk test (eks. Binax NOW) EIA Immunfluorescens	Kun <i>L. pneumophila</i> serogr.1  Monoklonale <i>L. pneumophila</i> antistoff
<b>Dyrkning</b> <sup>1</sup>	Luftveissekret	BCYE agar m/L-cystein 37°C fuktekammer 7 dager, daglig avlesning	Identifisering: Omsæd: BCYE m/L-cystein vekst Sjokoladeagar ikke vekst Agglutinasjon (eks. Oxoid kit) <i>Legionella sp.</i> <i>L. pneumophila</i> serogr. 1 <i>L. pneumophila</i> serogr. 2-14 Genotyping (utbruddsopklaring) eks. amplified fragment length polymorphism (AFLP)
<b>Nukleinsyre</b>	Luftveissekret Serum?, urin?	PCR	16S-rDNA-sekvensering Smeltepunktanalyse (Pontiac feber)

<sup>1</sup> Ikke anvendbar ved Pontiac feber

#### 1.2.1.1 Hvem gjør hva?

- Alle medisinsk mikrobiologiske laboratorier må tilby urin antigen testing.
- Alle medisinsk mikrobiologiske laboratorier må enten tilby dyrkning eller videresending for dyrkning.
- Laboratorier med spesiell interesse kan gjøre IF, PCR, genotyping etc.

#### 1.2.1.2 Antistoffpåvisning

- Pontiac feber diagnostiseres ved påvist antistoffstigning i serumpar
- Serologi ved mistenkt legionellose er ikke indisert i dag. Sensitivitet, spesifisitet og reproducerbarhet er for lav.
- Eneste gyldige kriterium for diagnose er  $\geq 4x$  stigning mot *L. pneumophila* serogruppe 1 serumpar.

#### 1.2.1.3 Referansefunksjon

Det er behov for etablering av nasjonal referansefunksjon.

## 1.3 Atypiske mykobakterier

### 1.3.1 Indikasjon for undersøkelse

Nedre luftveisinfeksjon og

- tidligere alvorlig lungesykdom
- pågående lungesykdom inkludert bronkiektasier og cystisk fibrose
- lokal eller systemisk immunsuppresjon og AIDS
- ved undersøkelse for mistenkt tuberkulose og funn av syrefaste staver, er atypiske mykobakterier viktig differensialdiagnostisk

### 1.3.2 Prøvemateriale

- Ekspektorat evt. indusert sputum  
vanligst, morgenekspektorat 3 dager
- Larynksutstryk
- Trakealinspirat
- Bronkialinspirat
- Bronkioalveolar lavage (BAL)
- Magesekksinspirat (spesielt barn)
- Urin
- Annet, f.eks biopsi

### 1.3.3 Analyser

- **Mikroskopi** mhp syrefaste staver
- **Dyrkning** er basisundersøkelsen, flytende medier gir bedre utbytte enn faste medier
- **Nukleinsyre påvisning**, 16S rDNA PCR med sekvensering, benyttes til identifisering av isolat (f.eks ved Folkehelseinstituttet, Rikshospitalet, Ullevål)
- **Resistensbestemmelse** av isolat utføres ved Folkehelseinstituttet. Hurtigvoksere kan resistensbestemmes med E-test ved Ullevål
- **Biokjemisk identifisering** av isolat utføres ved Folkehelseinstituttet, men betydningen av dette har avtatt

### 1.3.4 Tolkning

- Tilstedeværelsen av atypiske mykobakterier kan være et dårlig korrelat til for aktuell infeksjon. Fare for overbehandling.
- Enkelte atypiske mykobakterier er hyppigere korrelert til sykdom enn andre, for eksempel *M. avium*-komplekset, *M. kansasii*, *M. malmoense*.
- Verdien av resistensbestemmelse er usikker. Det er ikke nødvendigvis sammenheng mellom påvist *in vitro* følsomhet og *in vivo* effekt, f.eks for ethambutol og rifampicin.



### 1.3.5 Behandling

Om behandling skal iverksettes og i tilfelle ja, hvilken behandling, må bygge på overveier og samarbeid mellom infeksjonsmedisiner og mikrobiolog med spesialkunnskap.

Behandlingstiden er lang, opptil 2 år.

## 1.4 Pneumocystis

### 1.4.1 Klassifikasjon

Aktuell human patogen mikrobe heter nå *Pneumocystis jiroveci*, ikke *P. carinii*.

Aktuell mikrobe er en sopp, lignende gjærsopp, ikke en protozo.

*P. jiroveci* består av 4 genotyper til nå.

*P. jiroveci* kan gi "Pneumocystis-pneumoni" (PCP).

### 1.4.2 Indikasjon for undersøkelse

Nedre luftveisinfeksjon og immunsvikt som for

- HIV-AIDS pasienter med CD4  $<200 \mu\text{l}^{-1}$ .
- pasienter på immunosuppressiv behandling (f. eks. cancer, organtransplantasjon, systemisk corticosteroidterapi)
- premature, underernærte barn
- barn med immunsviktsykdom (SCID)

### 1.4.3 Prøvemateriale

- Bronkioalveolar lavage (BAL) er aktuelt for alle pasientkategorier.
- Indusert sputum spesielt for AIDS pasienter med store *Pneumocystis*-mengder
- Prøve fra øvre luftveier.
  - Lite validert metode. Ikke egnet for mikroskopi, kun evt. PCR. Bør kun benyttes dersom bedre materiale ikke kan skaffes som f.eks. små barn.
- Mindre aktuelt: Biopsi (lunge, trakea) med avtrykkspreparat

### 1.4.4 Analyser

Direkte påvisning benyttes. Bruk av laboratorier med godt utbygd analysetilbud og aktuell erfaring må vurderes.

#### 1.4.4.1 Mikroskopi

Mikroskopi krever erfaring

- Immunfluorescens med monoklonale antistoffer anbefales
- Alternative fargemetoder: Grogotte-Gomori sølvfarging, Periodic acid Schiff (PAS), toluidinblått-calcofluor white, Giemsa

#### 1.4.4.2 Nukleinsyrepåvisning

- PCR metodikk  
Mer sensitiv enn mikroskopi. Påvisning av *Pneumocystis*-DNA er ikke nødvendigvis assosiert med sykdom.
- PCR kan benyttes til å påvise sulfa-resistensgener

#### 1.4.4.3 Antistoffanalyser

- Har ingen plass i diagnostikken

### 1.5 Cystisk fibrose

#### 1.5.1 Viktigste luftveispatogener

*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia* sp., *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*

#### 1.5.2 Indikasjon for undersøkelse

Pasienter med kjent CF

- ”stasjonær” tilstand, rutinemessig hver 4.-6. uke
- ved tiltagende luftveissymptomer (infeksjonsutløst forverrelse?)

#### 1.5.3 Prøvemateriale

- Ekspektorat
- Nasopharynksaspirat hos barn
- Eventuelt: I forbindelse med diagnostiske eller terapeutiske inngrep:  
Bronkoalveolær lavage (BAL), bihulesekret, mellomøresekret etc.

#### 1.5.4 Analyser

##### 1.5.4.1 Mikroskopi

Mikroskopi av ekspektorat bør gjøres på disse pasientene for å vurdere materialets representativitet.

#### 1.5.4.2 Dyrkning

Medier	Betingelser
Brunskål Blodskål Salt-mannitolskål	35°C m/CO <sub>2</sub> min 2 døgn
Laktoseskål	35°C m/CO <sub>2</sub> min 3 døgn
Selektiv <i>Burkholderia</i> skål (se manus)	35°C luft min 3 døgn

#### 1.5.4.3 Identifikasjon

- Standard retningslinjer for identifisering
- Vær obs på mulig samtidig tilstedeværelse av flere arter.
- Sikker identifisering ved førstegangs isolering av *P. aeruginosa* er særlig viktig.
- Viktig å finne *Burkholderia* om den er til stede
  - Kan gi rask progresjon av sykdom. Kan smitte andre CF pasienter
- Kommersielle ID-systemer f.eks API 20 NE
- 16S rDNA PCR med sekvensering kan være aktuelt
- *Burkholderia* og *Burkholderia*-like stammer fra CF pasienter ønskes mottatt ved Mikrobiologisk avdeling, Ullevål universitetssykehus. Det kan bli aktuelt med nærmere undersøkelser ved referanselaboratorium i utlandet.

#### 1.5.4.4 Resistensbestemmelse

Valg av antibiotika / tilleggsantibiotika må vurderes ut fra

- Isolert mikrobe
- Standard oppsett ved avdelingen
- Isolerte øvrige mikrober
- Tidligere funn fra samme pasient
- Aktuell antibiotikabehandling
- Primære resistensfunn

## 2 SAMMENDRAG AV INNLEGGENE

---

### 2.1 *Mycoplasma pneumoniae* – agenspåvisning

Svein Arne Nordbø, Avdeling for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs Hospital

#### 2.1.1 Innledning

*Mycoplasma pneumoniae* (MP) infeksjoner forekommer i alle aldersgrupper, men er hyppigst blant skoleungdom og unge voksne. Alvorlige infeksjoner opptrer oftest hos eldre og pasienter med nedsatt immunforsvar. Barn under 6 måneder blir sjelden infisert med MP. Infeksjoner forårsaket av MP gir hyppigst symptomer fra øvre luftveier (sår hals, tracheobronkitt, tørrhoste), men ca. 1/3 av disse pasientene utvikler pneumoni. Asymptomatiske infeksjoner/ kolonisering forekommer også, og dette vanskeliggjør diagnostikken i betydelig grad. I tillegg kan MP-infeksjoner medføre ekstrapulmonale manifestasjoner (CNS, hjerte, blod, hud, slim-hinner og ledd). Inkubasjonstiden er 2 til 3 uker. Mistanken om MP-infeksjon kommer ofte sent i sykdomsforløpet, oftest pga langvarig hoste og terapivikt med betalaktam-antibiotika.

#### 2.1.2 Prøvetaking

Flere typer prøvemateriale fra luftveiene kan være aktuelt å undersøke. Mest aktuelt er halsprøve, nasofarynksaspirat og BAL. Ekspektorat er mer problematisk å undersøke. Mistenker man en systemisk infeksjon, har man muligheter til å kunne påvise MP direkte i blodprøver ved dyrkning eller DNA-påvisning. PCR eller annen genteknologisk metode gir best resultat og anbefales brukt som rutinemetode til påvisning av MP. Valg av prøvetakingsutstyr og transportmedium er langt mindre kritisk enn om prøvene skal dyrkes. Halspensel er mest praktisk å benytte i vanlig klinisk praksis. Erfaringer viser at dette materialet inneholder minst inhibitorer av de aktuelle prøvematerialene, og samme materiale kan benyttes til å påvise en rekke andre aktuelle agens som kan gi luftveisinfeksjoner. MP er sterkt celle-assosiert, og det er derfor viktig å få med seg mest mulig celler ved prøvetakingen for å oppnå en akseptabel sensitivitet. Prøvepinnen kan sendes i et vanlig transportmedium for bakterier eller virus. Det er også mulig å gjøre DNA-ekstraksjon fra tørre prøvepinner.

Dersom man skulle ønske å dyrke MP er valg av prøvepinner viktig. Det kan benyttes pensler med calciumalginat, dacron eller polyester. Skaftet bør være av plastikk eller aluminium. Treskaft må ikke benyttes! Prøvepinnen røres godt rundt i transportmediet og fjernes før forsendelse til laboratoriet. MP er følsom for uttørring og varme, og transporttiden bør være så kort som mulig. SP-4, Shepards 10B buljong og 2SP-medier kan benyttes både til dyrkning og PCR.

## 2.1.3 Diagnostikk

### 2.1.3.1 Dyrkning

MP kan dyrkes både på flytende, faste og difasiske medier. SP-4 medium er mye brukt av referanselaboratorier. Bakterien er langsomtvoksende, og prøvene bør inkuberes ved 37°C i 5-10% CO<sub>2</sub> i 4 uker og avleses med noen dagers mellomrom. Noen bruker HeLa 229 celler som feederlayer og immunfluorescens som påvisningsmetode for å korte ned svartiden, men dyrkning er en lite sensitiv (ca. 60% sammenliknet med PCR) og tidkrevende metode som ikke har noen plass i rutinediagnostikken. Dyrkningsteknikken stiller meget store krav til medieproduksjonen da det er spesielt viktig at alle serumtilsetninger er garantert mycoplasmafrie.

### 2.1.3.2 Genmolekylære metoder

*NASBA* er en isoterm amplifikasjonsteknikk som benytter RNA som templat. RNA brytes mye raskere ned enn DNA, og er derfor en mer pålitelig markør for en aktuell infeksjon enn DNA som kan persistere i flere måneder etter en infeksjon. Deteksjon av rRNA kan i teorien være mer sensitiv enn PCR fordi det er mange rRNA molekyler tilstede i hver bakterie, men i praksis har metoden sammenlignbar sensitivitet med PCR som detekteres med prober. En praktisk ulempe med denne metoden er at den er mer komplisert og tidkrevende enn moderne PCR-teknikker, og at RNA raskt brytes ned i prøven dersom man ikke benytter et optimalt transportmedium.

PCR er kanskje den metoden som er best egnet til klinisk diagnostikk av MP. De mest benyttede genområdene for deteksjon er P1 adhesin genet, 16S rRNA genet og ATPase operon genet. Nested PCR og PCR som bruker hybridiseringsprober er opptil 100 ganger mer sensitiv enn standard single PCR med gelelektroforese. Det finnes også kommersielle multiplex-PCR kit som kan detektere flere agens i samme kjøring. Real-time PCR har mange praktiske fordeler. Det er en meget rask metode som gir et semikvantitativt svar som kan være nyttig for vurderingen av den kliniske betydningen. Sensitiviteten og spesifisiteten er like god som nested PCR, og kontaminasjonsfaren er betydelig redusert. I tillegg er det den best egnede metoden for kvantitering av målsekvensen. Det anbefales å benytte internkontroll til alle prøvene for å påvise evt. inhibisjon av Taq-polymerasen. RT-PCR som påviser RNA i prøven kan være nyttig for å vurdere om det er tegn til aktiv infeksjon.

Det finnes også andre genbaserte amplifikasjonsteknikker som kan være aktuelle å benytte, men foreløpig er disse metodene ikke kommersielt tilgjengelig for MP. Mikromatriseteknologien vil sikkert spille en viktig rolle i årene som kommer, men representerer ikke noe alternativ for påvisning av MP på det nåværende tidspunkt.

Det bør understrekes at optimal forbehandling og ekstraksjonsteknikk av nukleinsyrene er svært viktig for å oppnå best mulig sensitivitet, uansett hvilken molekylærgenetisk metode man benytter. Viskøse prøver representerer en stor diagnostisk utfordring, og forbehandling med proteinase er viktig.

### 2.1.3.3 Andre metoder

Direkte IF, motstrømselektroforese, EIA og DNA-prober for påvisning av 16S rRNA har vært brukt til påvisning av MP i noen år, men anbefales ikke brukt i dagens situasjon fordi de har for lav sensitivitet sammenliknet med PCR og andre genbaserte amplifikasjonsmetoder.

### 2.1.4 Konklusjon

Det finnes ingen ”gullstandard” eller referansemetode for agenspåvisning av MP. Konvensjonell dyrkning er for lite sensitiv og altfor tidkrevende til å brukes i rutinediagnostikken, men kan være av verdi i forskningssammenheng og for enkelte referanselaboratorier. Metoder for direkte antigenpåvisning uten amplifikasjon anbefales ikke pga for lav sensitivitet, og noen av disse testene har heller ikke god nok spesifisitet. Best egnet til denne diagnostikken er molekylærgenetiske metoder med amplifikasjon, men det er foreløpig få kommersielle alternativer på det norske markedet. Av de ulike PCR-variantene har real-time PCR mange åpenbare fordeler både praktisk og kvalitetsmessig, og vil etter hvert kunne bli tilgjengelig for de fleste mikrobiologiske laboratorier som skaffer seg kompetanse innen dette feltet.

### 2.1.5 Litteratur

1. Daxboeck F, Krause R, Wenisch C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Microbiol Inf* 2003; 9: 263-73.
2. Ieven M, Goossens H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 242-56.
3. Loens K, Ursi D, Ieven M, van Aarle P, Sillekens P, Oudshoorn P, Goossens H. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in spiked clinical samples by nucleic acid sequence-based amplification. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1339-45.
4. Honda J, Yano T, Kusaba M, Yonemitsu J, Kitajima H, Masuoka M, Hamada K, Oizumi K. Clinical use of capillary PCR to diagnose *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1382-4.
5. Waring AL, Halse TA, Csiza CK, Carlyn CJ, Arruda Musser K, Limberger RJ. Development of a genomics-based PCR assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in a large outbreak in New York State. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1385-90.

## 2.2 Mycoplasma pneumoniae – antistoffpåvisning

Tore Jarl Gutteberg, Mikrobiologisk avdeling, Universitetssykehuset i Nord-Norge

### 2.2.1 Innledning

*Mycoplasma* er en bakterie uten cellevegg men med sterolinneholdende plasmamembran (Figur 1, Baseman & Tully 1997). Den kan vokse i cellefritt medium og etablerer seg hos mennesker i nær kontakt med luftveiseepitel og mellom dets cilia (Figur 2, Baseman & Tully 1997). Den biologiske klassifisering er:

Klasse: Mollicutes  
Order: Mycoplasmatales  
Familie: Mycoplasmataceae  
Genus: Ureaplasma urealyticum  
Mycoplasma pneumoniae  
Mycoplasma salivarium  
Mycoplasma hominis

*Mycoplasma pneumoniae* forårsaker sår hals, bronkitt og pneumoni.

*Mycoplasma pneumoniae* smitter person til person gjennom dråpesmitte og ved direkte kontakt. *Mycoplasma hominis* og *Ureaplasma urealyticum* kan gi uretritt.

#### Alle kan få Mycoplasma

Barn under 5 år har et mildt forløp. Mest vanlig å se sykdom hos tenåringer og unge voksne. Epidemier kan forekomme, vanligvis om høsten.

De vanligste symptomer er:

- Hodepine
- Trøtthet
- Hoste ofte med spasmer (voksen kikhoste)
- Ubehag i brystet
- Sårhet i svelget
- Feber

Inkubasjonstid 6 til 32 dager. Sykdom varer fra dager til måneder, smittefare de første 20 døgn? . Kikhoste hos eldre barn og voksne er en viktig differentialdiagnose.

### 2.2.2 Diagnostikk

*Mycoplasma pneumoniae* er vanligvis diagnostisert med serologi, røntgenbilde av lunger og PCR fra adekvat luftveismateriale. Den beste, hurtigste, mest sensitive og spesifikke metode er PCR. Antistoff målinger blir et dårlig nummer to eller tre som muligens øker sin spesifisitet gjennom parallell analyser men taper ytterligere på hurtighet (Baum 2002).

En historisk oversikt 1994-2002 på vår avdeling viser forekomsten av *Mycoplasma pneumoniae*. Året 1998 brukte vi Mycoscan og fant vi ca 11% av landsgjennomsnittet og det

var høyt. Etter 1998 har vi brukt Virion og vår andel av positive funn vært under landsgjennomsnittet. I 1998 I 2002 gikk våre positive funn ned fra tidligere. Har våre kampanjer for bruk av PCR redusert bruken av serologi? Avdeling for virologi sin oversikt over positive funn for 2002 viser stor geografisk skille på positive funn. Antallet positive funn har øket de siste 8 årene. Uten at det har ført til noen bekymringer i vårt fagmiljø. Et laboratorium som bruker KBR og et annet som bruker Savyon IgM har relativt mest funn uten at forklaringen synes bare å ligge der. Flere laboratorier som bruker KBR har heller beskjedne funn. Denne oversikten viser Agder, Møre og Romsdal med mest positive funn av *Mycoplasma pneumoniae*. Men har de mest infeksjoner?

KBR har en mindre sensitivitet og følsomhet og mangler IgG komponenten som kan være viktig å få med (Baum 2002).

ELISA med mulighet til å se IgM som en akutt parameter og IgG som en parameter som peker på gjennomgått eller residiverende infeksjon ved parallellkjøring. Strengt tatt skal en se titer ending på 4 trinn for å kalle det signifikant. Gjøres det? IgA sin plass i serologisk diagnostikk er fortsatt kontroversiell og krever mer dokumentasjon. Uansett hvordan man ser det, er serologi tidkrevende for pasienten som venter på svar. For legen er det lang tid å vente uker på et mykoplasma/kikhostesvar. I våre hender kan vi gi ut et PCR svar på 3 dager og vi er misfornøyd med det!

### 2.2.3 Behandling

Macrolid som Erytromycin 10 mg/kg x 4 (eller 20 mg/kg x 2) p.o. i 7-10 dager eller Doxycyclin p.o. / i.v. 2,2 mg/kg 2 gg daglig i 5 dager. Selv etter behandling kan *Mycoplasma* være i svelget i 13 uker.

### 2.2.4 Oppsummering

Serologisk diagnostikk av *Mycoplasma pneumoniae* er tidkrevende slik at behandling oftest er begynt før endelig diagnose. *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma salivarium* og *Mycoplasma hominis* kan finnes hos friske mennesker. *Mycoplasma pneumoniae* vil gi sykdom. Det kan være kryssreaksjon mellom disse agens. Det er vanskelig å finne god dokumentasjon for spesifisitet. Mange av de tester som tilbys har begrenset kliniske valideringsrapporter. I Tromsø har vi valgt å vektlegge PCR til agenspåvisning og redusere bruken av serologi. Serologi har sin plass for å påvise et immunologisk spor om det er gjennomgått infeksjon eller ganske nylig oppstått infeksjon. Parallellkjøring av prøver vil øke sikkerheten i den serologiske diagnostikken. Viss en vektlegger hurtighet og spesifisitet så er den diagnostiske styrke således: PCR > ELISA IgM/IgG > KBR

### 2.2.5 Litteratur

1. Baum SG. *Mycoplasma* infection: immunologic and molecular biologic diagnostic techniques. In: Rose NR, Hamilton RG, Detrick B, eds. Manual of clinical laboratory immunology. 6th ed. Washington DC, USA: ASM Press, 2002, pp 516-21
2. Baseman JB, Tully JG. *Mycoplasmas*: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. Emerg Infect Dis. 1997; 3: 21-32. (Review)
3. Månedsmeldinger for laboratoriediagnoser 1994-2002, Nasjonalt Folkehelseinstitutt.



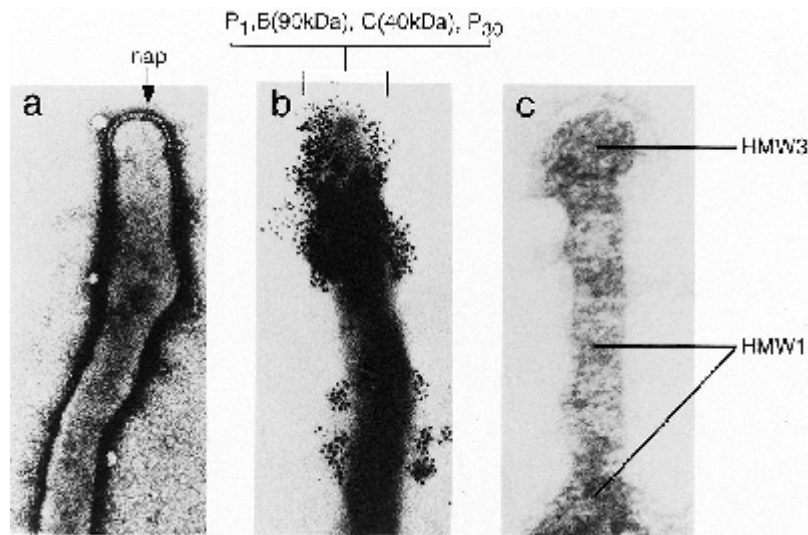
**Tabell 1 Diagnostikk av *Mycoplasma pneumoniae* infeksjon i Norge og Tromsø**

	Antall laboratoriebekreftede funn av <i>Mycoplasma pneumoniae</i> infeksjon pr år								
	2002	2001	2000	1999	1998	1997	1996	1995	1994
Antigenpåvisning									
Norge	52	45	59	12					
Tromsø	47	45	59	12					
% andel Tromsø	90,4	100	100	100					
Antistoffpåvisning									
Norge	5393	5451	6546	4401	4155	2534	2144	2267	1695
Tromsø	91	266	217	178	462	142	114	37	33
% andel Tromsø	1,7	4,9	3,3	4,0	11,1	5,6	5,3	1,6	2,0
Antistofftest benyttet i Tromsø	Virion IgM/A/G				Mycosc IgM/A/G	Savyon IgM/tot		KBR	

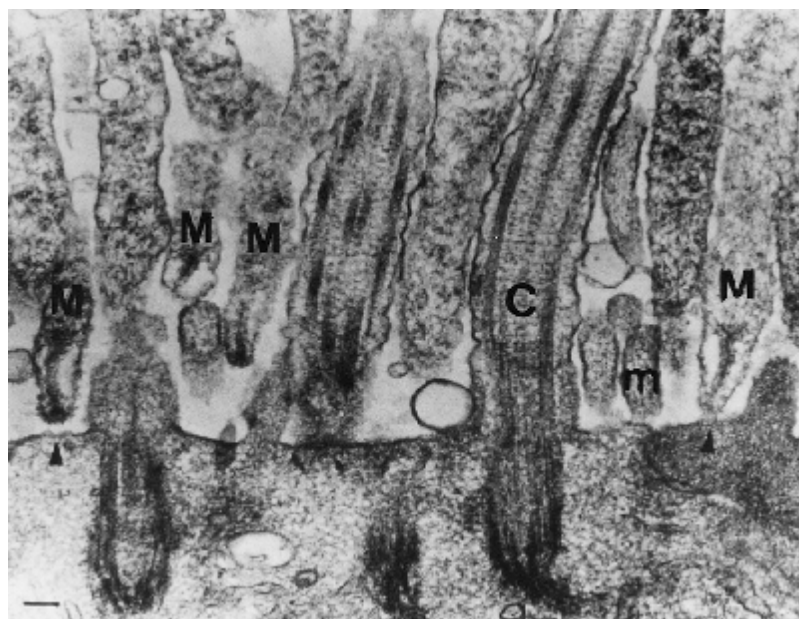
**Tabell 2 Diagnostikk av *Mycoplasma pneumoniae* infeksjon i Norge i 2002**

Laboratorium	Antall positive funn		Metode
	Agens	Antistoff	
Folkehelseinstituttet	0	1	
Rikshospitalet	0	0	Platelia IgM
Fredrikstad	0	99	Virion
A-hus	0	197	Platelia IgM
Bærum	0		
Ullevål	0	446	PCR/Platelia IgM
Lillehammer	0	290	Thermo IgM
Drammen	0	28	KBR
Tønsberg	0	235	Platelia IgM
Telelab	0	96	Thermo IgM
Kristiansand	3	1625	Savyon IgM
Rogaland	0	366	KBR
Haukeland	0	283	Platelia IgM/IgG
Førde	0	0	
Molde	0	1276	KBR
St. Olav	2	202	PCR/Platelia IgM/IgG
Innherred	0	0	
Bodø	0	157	Platelia IgM
Tromsø	47	91	Virion IgM/A/G
<b>SUM</b>	<b>52</b>	<b>5393</b>	

**Figure 1.** Transmission electron photomicrographs of the specialized tip organelle of cytoadherence-positive *M. pneumoniae* demonstrating a) truncated structure with nap, b) clustering of cytoadherence-related proteins (P1, B, C, P30) at the tip based on immunolabeling with ferritin and colloidal gold and crosslinking studies, and c) Triton X-100-resistant, cytoskeleton-like, structure with distinct bleb and parallel filaments (Baseman 1997).



**Figure 2.** Transmission electron photomicrograph of a hamster trachea ring infected with *M. pneumoniae*. Note the orientation of the mycoplasmas through their specialized tiplike organelle, which permits close association with the respiratory epithelium. *M. mycoplasma*; m, microvillus; C, cilia (Baseman 1997).



## 2.3 Chlamydia pneumoniae - agenspåvisning

Dag Hvidsten, Mikrobiologisk avdeling, Universitetssykehuset i Nord-Norge

### 2.3.1 Innledning

Chlamydiae er små ubevegelige bakterier. Det er fire species hvorav de tre førstnevnte gir human sykdom: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. pecorum*. Chlamydias *elementærlegeme* er metabolsk inaktivt, men dyrkbart, går inn i vertscellen hvor det skjer en transformasjon til det metabolsk aktive ikke dyrkbare intracellulære *retikulærlegemet*. Vertsceller for retikulærlegemet er hovedsakelig epitelceller og monocytter/makrofager. Yttermembranproteinet (omp) i elementærlegemet antas å være den virulente og antigene struktur, og dette utnyttes i diagnostikken.

### 2.3.2 Sykdommer

Mennesket er eneste kjente reservoar for *C. pneumoniae* (1,2). Bakterien infiserer fortrinnsvis luftveiene:

- faryngitt
- sinusitt
- bronkitt (5 % av alle)
- atypisk pneumoni

*C. pneumoniae* er assosiert med ...

- Asthma bronchiale
- Kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS) (3)

#### 2.3.2.1 Hva er "atypisk pneumoni"?

Det er vanskelig å finne brukbar definisjon. Kalles også "walking pneumonia". Pasienten er "ikke så syk som ved typisk pneumoni"; "rtg. thorax ser verre ut enn pasienten", legen "hører lite, ser mye"; bedres ikke av betalaktam-antibiotika, involverer andre organsystem enn luftveiene. Atypisk pneumoni forårsakes av *Mycoplasma pneumoniae*, adenovirus, influensa A og B, Legionella og *C. pneumoniae*. *Coxiella burnetti* (Q-fever) nevnes i amerikansk litteratur. SARS-pneumonien er også kalt atypisk, og dermed har uttrykket fått en ny klang.

### 2.3.3 Indikasjoner

- Etiologisk diagnose ved behandlingstrengende infeksjon
  - pneumoni
  - exacerbasjon av astma eller KOLS
- Begrense epidemi av *C. pneumoniae* (for eksempel i militærleire)

#### 2.3.3.1 Hvilke likheter?

- Akutt hoste
- *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* og *Bordetella pertussis* kan starte med "forkjølelse"

- Langvarig eller **kronisk hoste** er den mest typiske problemstilling på rekvisisjoner
- Lav CRP skiller særlig ”atypiske agens” (unntatt Legionella) fra ”typiske”
- Moderat forhøyet SR ved infeksjon med *M. pneumoniae* og *C. pneumoniae*
- Hoste til brekning ved *M. pneumoniae* og *B. pertussis*
- God allmenntilstand og bifasisk forløp ved *B. pertussis*- eller *C. pneumoniae*-infeksjon

### 2.3.3.2 Hva skiller de tre?

*B. pertussis*: Gir sjelden pneumoni i våre dager, og har etter den katarralske fasen en mer eller mindre typisk kikhoste, lite ØLI-symptomer og ingen feber.

*M. pneumoniae*: Typiske pneumonisyntomer er sjelden i de første tre-fire leveår.

*C. pneumoniae*: Pneumonidiagnosen sjelden hos *C. pneumoniae*. Under en epidemi i Indre Troms i 2000:kun et par rekrutter fikk diagnosen atypisk pneumoni blant flere hundre syke. I Finnmark var sju soldater med *C.pneumoniae*-infeksjon innlagt, rtg. thorax ble tatt hos seks: alle normale. ”Det eneste som skilte dette utbruddet fra forkjølelse, var at det varte så lenge” (4)

### 2.3.3.3 Når i forløpet påvise *C. pneumoniae*?

Inkubasjonstid: *C. pneumoniae* minst 10 dager, gjennomsnitt 21 dager.

Ved påvisning av agens kan det tas fra første dag (?). *C. pneumoniae* kan påvises hos asymptotiske bærere. Normann et al (5) fant under en *C. pneumoniae* epidemi i Gävle at >20% av barnehagebarn var PCR positive. Blant barnehagepersonalet og barnas mødre var det også >20% positive. Det var ikke korrelasjon mellom symptomer og funn. Det ses persistens av bakterien etter antibiotikabehandling hos ca.10%.

## 2.3.4 Prøvemateriale

- Nasofarynks
- Orofarynks
- Ekspektorat
- BAL
- (PCR fra mononukleære celler i perifert blod)

Verkooyen (6) viste at prøve tatt fra nasofarynks fanger opp dobbelt så mange positive som svelgprøve. I deres undersøkelse var alle ekspektoratprøver negative! Prøvemateriale fra nedre luftveier kan inneholde hemmere ved dyrkning eller PCR. Bomann et al (7) fant at ekspek-toratoratprøver var best (ekspektorat>svlg>nasofarynks). Ved UNN anbefales nasofarynksprøve, (ev. også fra orofarynks, og da helst med ny pinne som kan settes i samme transportmedium). Når man tar prøver, bør det tas fra en lokalisasjon hvor man kan forvente å finne de fleste agens som kan forårsake pasientens symptomer. Ved *B. pertussis*-infeksjon er det anbefalt å ta fra nesetaket til dyrkning. *C. pneumoniae* kan ikke dyrkes fra blod, men det er funnet ved PCR fra mononukleære celler.

### 2.3.4.1 Hvordan tas prøven?

Ekspertgruppen som ga retningslinjer vedrørende undersøkelser på *C. pneumoniae*, foreslår aluminiumspinne med dacron (8). Bomull eller calcium alginat på trepinne anbefales ikke.

Det foreslås at transportmediet skal inneholder gentamicin, amphotericin B og vancomycin. BAL, ekspektorat og pleuravæske anbefales samlet i transportmedium i forholdet prøve til medium på 1:2. Transporttiden bør være så rask som mulig. Prøver som skal us. innen 24 timer må holdes på +4°. Prøver som skal undersøkes senere burde fryses til -70°C. Vi har sendt ut skriftlig ”bruksanvisning” til våre rekvirenter hvordan prøven tas. Der angir vi også hvor langt pinnen bør inn i nesen (ca 8 cm). Til små barn kan matingssonde brukes til å suge sekret fra nasofarynks.

### 2.3.5 Valg av metode

- Direktepåvisning ved IF eller DFA
- Dyrkning
- PCR

#### 2.3.5.1 Påvisning direkte i prøvematerialet

Ut fra månedsmeldingene kan en lese at i Norge påvises ikke *C. pneumoniae* med IF eller DFA. Produsenten Imagen lager et fluorescein isothiocyant (FITC)-merket monoklonalt antistoff rettet spesifikt mot *C. pneumoniae*. Produsenten oppgir at det ikke brukes lenger i Norge, men at flere laboratorier har brukt det tidligere.

#### 2.3.5.2 Dyrkning

Dyrkning er vanskelig selv i trenede hender. Derfor brukes ikke dyrkning til rutineundersøkelser lenger. I USA gjøres dette kun i referanselaboratorier og til vitenskapelig undersøkelse av viabilitet av bakterier og av resistens. Folkehelseinstituttet har i år sluttet å gjøre dette.

#### 2.3.5.3 Polymerase kjedereaksjon (PCR)

PCR brukes rutinemessig til påvisning av *C. pneumoniae*-agens i Norge. Det er kun in-house metoder. Ekspertgruppen (8) konkluderte at det fram til år 2000 kun var fire artikler som tilfredsstillende beskrev kriterier for PCR. Det ble bl.a. nevnt å sammenligne: 1) PCR med et sensitivt kultursystem; 2) PCR med minst en annen validert PCR som har target på et annet gen (eller annen sekvens på samme gen). For øvrig ble ulike prinsipper for å øke sensitivitet og spesifisitet av in-house PCR beskrevet: ved bruk av ”nested PCR”, ”hot-start” og ”touchdown”. Real-time PCR gjøres i dag på St.Olavs hospital (Taq-man) og på UNN (SYBR Green). Disse metodene er automatisert. Primerne til SYBR Green er rettet mot ompA genet (9). Sekvensen er hentet fra delsekvensen til dette genet med ”accession”: AF 347608, og skal gi et amplicon på 51 basepar. Metoden har med en internkontroll, og vi setter opp to paralleller for hver pasientprøve. Det er videre med en *C. pneumoniae* ekstern kontroll, en fiktiv prøve (en bakterie) og en negativ kontroll (ddH<sub>2</sub>O) i oppsettet. Før vi gikk over til nåværende PCR-metode, brukte vi ”nested PCR”. Ytterprimerne var rettet mot ”major outer membrane genes” fra *C.pneumoniae* og *C. psittaci*. Innerprimerne var kun rettet mot *C. pneumoniae*. Avhengig av svaret kunne vi si noe om ev. tilstedeværelse av begge bakteriene. På Sørlandet sykehus HF har man i løpet av det siste året begynt med NASBA-teknikk (nucleic acid sequence based amplification). Vi har ikke tall for sensitivitet og spesifisitet siden det er svært vanskelig når det ikke er noen god gullstandard (dyrkning).

**Tabell 1. Frekvens *C. pneumoniae*/respiratorisk chlamydia 1998-2002. Sammendrag av månedsmeldinger (10)**

Hele landet	1998	1999	2000	2001	2002
Agenspåvisning	1	7	32	9	50
Serologi <i>C.pneumoniae</i> *	12	9	60	135	1542
Serologi Respiratorisk chlamydia**	3584	2293	2284	2442	2005

\* Serologi som påviser *C. pneumoniae* bruker yttermembranproteinet (omp) som antigen.

\*\* Ved respiratorisk chlamydia brukes det chlamydiaspeciesspesifikke LPS

#### 2.3.5.4 Hva er best til å påvise *C. pneumoniae*?

Prøver til PCR har fordeler fram for serologi: påvisning i de første sykdomsdager, det er enklere prøvetaking (og mindre smertefull?) enn blodprøve; ingen sentrifugering, må ikke utføres av lege/sykepleier. Til sammenlikning - ved *C. pneumoniae* primærinfeksjon kommer IgM først 2-3 uker etter sykdomsstart.

I en nylig gjennomført us. i allmennpraksis i Nord-Norge fulgte man CRP ved ØLI. Av 42 pasienter ble det funnet sannsynlig etiologisk agens hos 30. Tjueto fikk diagnosen ved PCR tatt i løpet av de tre første sykdomsdagene. Det var funn av agens som også forårsaker atypisk pneumoni (blant annet influensa A (6), influensa B (7), rhinovirus, undersøkt på St. Olavs hospital (5), adenovirus (1), parainfluensa 1 (1), parainfluensa 3 (1), RSV (1) (Hasse Melbye, personlig meddelelse).

Hos 72 % av *C. pneumoniae* PCR positive barnehagebarn ble det ikke påvist antistoffer mot *C. pneumoniae*. Kun to av 18 PCR positive barn under 2 år hadde antistoffer (5). Skal *C. pneumoniae* påvises i denne aldersgruppen, bør det tas PCR.

#### 2.3.6 Sammendrag

*C. pneumoniae* er en bakterie som kan gi atypisk pneumoni, men hyppigere gir en banal infeksjon i luftveiene. I Norge påvises infeksjonen mest ved serologi, men bakterien kan påvises i sekret fra luftveiene ved PCR-metode. Tatt initialt under sykdomsforløpet kan positiv PCR gi svar på mikrobiologisk etiologi flere uker før serologi.

#### 2.3.7 Litteratur

1. Høiby N. Basal og klinisk mikrobiologi. Århus: FADL's Forlag, 1998
2. Atypical pneumonia. I: Pechère JC, ed. Community-acquired pneumonia in children. International Forum Series. West Sussex: Cambridge Medical Publications, 1995: 55-61
3. Hahn DL. Chlamydia pneumoniae, asthma and COPD: what is the evidence? Ann allergy 1999; 83: 271-88.
4. Berdal BP, Scheel O, Gutteberg TJ, Halvorsen DS, Hetlevik Ø, Ingebrigtsen T, Mo B, Ånestad G. Chlamydia pneumoniae (TWAR) Epidemiology: Experience from Norway. I: Mårdh PA, Saikku P, red. Chlamydial infections of the genital and respiratory tract and allied conditions. Jyväskylä: Gummerius kirjapaino OY, 1991: 64-71
5. Normann E, Gnarpe J, Gnarpe H, Wettergren B. Chlamydia pneumoniae in children attending day-care centers in Gävle, Sweden Pediatr Infect Dis J 1998; 17: 474-8.

6. Verkooyen RP et al. Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of Chlamydia pneumoniae respiratory infections. J clin microbiol 1998; 36: 2301-7.
7. Dowell SF, Peeling RW, Boman J and the C.pneumoniae Workshop participants. Standardizing Chlamydia pneumoniae Assays: Recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). CID 2001; 33: 492-502.
8. Boman J, Allard A, Persson K, Lundborg M, Juto P, Wadell G. Rapid diagnosis of respiratory Chlamydia pneumoniae infection by nested touchdown polymerase chain reaction compared with culture and antigen detection by EIA. J infect dis 1997; 175: 1523-6.
9. Gutteberg TJ. Chlamydia pneumoniae PCR og fluorometrisk deteksjon. Metodikk UNN. 2001
10. Månedsmeldinger for laboratoriediagnoser 1998-2002. Oslo: Nasjonalt folkehelseinstitutt.

## 2.4 Chlamydia pneumoniae - antistoffpåvisning

Peter A. Csángó, Mikrobiologisk avdeling, Sentralsykehuset i Vest-Agder

### 2.4.1 Innledning

*Chlamydia pneumoniae*, ble først påvist i 1965 ved London Institute of Ophthalmology (IOL-207) og noen måneder senere ved Universitetet i Washington i Seattle. Inntil nylig har man brukt betegnelsen TWAR og *Chlamydia pneumoniae*. *Chlamydophila pneumoniae* er mikrobens offisielle navn (Tabell 1 ; Mahony 2003)

**Tabell 1. Taksonomi av orden Chlamydiales**

Orden: Chlamydiales (Mahony et al. 2003)
Familie:
I. <i>Chlamydiaceae</i>
Slekt:
1.) <i>Chlamydia</i>
<i>C trachomatis</i>
<i>C muridarum</i>
<i>C suis</i>
2.) <i>Chlamydophila</i>
<i>C pneumoniae</i>
<i>C pecorum</i>
<i>C psittaci</i>
<i>C abortus</i>
<i>C caviae</i>
<i>C felis</i>
II. <i>Simkaniaceae</i>
<i>Simkania negevensis</i>
III. <i>Parachlamydiaceae</i>
<i>Parachlamydia acanthamoeba</i>
IV. <i>Waddlia</i> WSU 86-1044

Antistoffundersøkelse er fortsatt det viktigste instrument i diagnostikk av *C. pneumoniae* infeksjon. Den typiske anamnesen er ”langvarig hoste”. Serologi er den beste diagnostiske metode i slike tilfelle. Boman et al. har vist at påvisning av *C. pneumoniae* i luftveier var ledsaget av antistoffprofil forenlig med en aktuell infeksjon under en epidemi. Antistoff kunne detekteres hos 96% av PCR positive pasienter (Boman 1997).

Det finnes sannsynligvis et tidlig ”vindu ”, når man kan påvise *C. pneumoniae* før antistoffrespons. Det er beskrevet prøver som er både dyrknings- og PCR-positive hos pasienter uten antistoff (Persson K. Pers. comm., 2003). PCR-positive, men dyrkningsnegative tilfelle hadde ofte IgM, av og til også IgG antistoff. Dette kan tyde på at mengden organismer minsker etter hvert under sykdommen og kan bare påvises med den mer følsomme PCR



metoden (Boman 1997). Under de første 2-3 uker bør man forsøke med en amplifikasjonsteknikk, PCR eller NASBA, -etter denne tid kan antistoffsvar være målbart og serologi blir diagnostisk nyttig.

Det er visse problemer knyttet til antistoffmåling

- De vanligste serologiske reaksjoner er genusspesifikke.
- Det samles ikke parsera
- Høy antistoffbakgrunn i enkelte populasjoner
- Ikke standardiserte reagenser

For pasienter med akutt *C. pneumoniae* infeksjon er det viktig å ta hensyn til antistoffsvarets kinetikk som er spesiell ved *C. pneumoniae* infeksjoner (Tabell 2). Det er beskrevet to typer antistoffrespons mot *C. pneumoniae*.

1. Ved primærinfeksjon kommer en hurtig IgM-antistoff, inklusive en KBR respons, men denne type immunsvaret uteblir som regel ved sekundærinfeksjoner. Ved primærinfeksjoner kommer IgM- og IgG-antistoffer henholdsvis 3 og 6-8 uker etter sykdommens debut. *C. pneumoniae* gir ikke god immunitet og reinfeksjon kan forekomme.
2. Ved reinfeksjoner kan KBR og *C. pneumoniae*-IgM respons helt utebli mens høye spesifikke IgG-titert er målbare allerede etter 1-2 uker.

**Tabell 2. Kinetikk ved *C. pneumoniae*-antistoffrespons m/MIF og KBR**

	IgM	IgG	KBR
Akutt infeksjon			
2-3 uker	128	0	16
6-8 uker	32	256	128
Reinfeksjon			
3 uker	0	16	0
8 uker	0-32	1024	0

## 2.4.2 Komplementbindingsreaksjon (KBR)

I KBR er det kryssreaksjon med *C. trachomatis* og *C. psittaci* noe som kan føre til tolkningsproblemer. KBR er basert på en gruppespesifikk lipopolysakkarid chlamydiaantigen. KBR har vært anvendelig i diagnosen av lymfogranuloma venereum og ornithose. Med denne metoden viser parsera  $\geq 4$  x titerstigning under en aktuell primærinfeksjon, mens i noen tilfelle kan serokonversjon ta 4-8 uker.

Ved *C. pneumoniae* reinfeksjoner blir KBR bare svak positiv eller negativ. I tillegg må vi regne med at siden begge infeksjonene forekommer hyppig, finnes det noen som har anti-stoff både mot *C. trachomatis* og *C. pneumoniae*. KBR anbefales ikke lenger av en interna-sjonal ekspertgruppe for standardisering av chlamydiaundersøkelser (Dowell SF et al. 2001).

### 2.4.3 Mikroimmunofluorescens

Mikroimmunofluorescens (MIF) er gullstandard i serologisk diagnostikk av *C. pneumoniae* infeksjoner (Wang 2000). MIF er basert på rensede formalinbehandlede elementærlegemer av chlamydia fiksert på objektglass. Undersøkelsen er teknisk krevende, tolkningen er subjektiv og vurderingen av MIF slides krever erfaring.

MIF tillater kvantitativ bestemmelse av antistoff. Metoden er sensitiv og kan skille mellom chlamydiaarter. Den kan brukes til diagnose av ornithose (*C. psittaci*), genitalinfeksjon (*C. trachomatis*, inkl. LGV) og luftveisinfeksjon med *C. pneumoniae*. MIF er den beste metode i forbindelse med diagnostikk av luftveisinfeksjoner forårsaket av *C. pneumoniae*. Det finnes kun én serovar av *C. pneumoniae* og kryssreaksjon med andre chlamydiaarter er ubetydelig når testen er utført hensiktsmessig.

#### 2.4.3.1 IgM og IgG antistoff

Serumprøven undersøkes for IgM og IgG antistoff først med en fortykning på 1:8, deretter med en 2x fortykninger til 1:1024. De diagnostiske kriteriene/titerverdier for akutt infeksjon med *C. pneumoniae* er basert enten på demonstrasjon av spesifikt IgM antistoff,  $\geq 4x$  titerstigning av IgG i parsera, eller på IgG antistoffnivå  $\geq 512$  i én prøve. Enkeltprøver kan ha en mulig verdi hvis man tar hensyn til kliniske symptomer, mens serumpar tillater bestemmelsen av titerendringer.

#### 2.4.3.2 IgA antistoff

IgA antistoffets rolle ved infeksjoner forårsaket av *C. pneumoniae* er omdiskutert.

Det er delte oppfatninger om chlamydia IgAs rolle ved aktuelle og persisterende/kroniske infeksjoner. Ifølge Wang (Wang 2000) er det bare  $<50\%$  av pasienter med *C. pneumoniae* infeksjon som danner spesifikt IgA antistoff og han mener at det er ingen grunn til å oppfatte IgA antistoff som en nyttig markør verken ved akutt eller kronisk chlamydiainfeksjon. I tråd med dette tror flere at verken aktuell eller kronisk chlamydiainfeksjon kan assosieres med tilstedeværelse av IgA antistoff (Dowell et al. 2001; Boman & Hammerschlag, 2002; Persson 2003. pers. comm.). En rekke publikasjoner tyder imidlertid på at IgA antistoffer kan ha betydning ved visse kroniske tilstander (Falck 2002; Huittinen 2003; Lieberman 2001; Pieniazek 2003; Wolf 2003; Wong 2002).

Følgende titerverdier kan brukes i diagnostikken av *C. pneumoniae* infeksjon (Tabell ).

**Tabell 3. Anbefalinger for bruk av *C. pneumoniae* infeksjon med MIF  
(Etter Dowell et al. 2001)**

Antigen
Renografin rensede, elementærlegemer i PBS med 0,02% formalin, fiksert med acetone
Serumprøver
Serumpar tatt med 4-8 ukers mellomrom
Undersøkelse
Screen ved 1:8 eller 1:16 og 2x fortyning til endepunktet. Evan's blue kontrastfarge
Slidene bør leses med 40x akromatisk objektiv
Aktuell infeksjon
IgM: $\geq 16$ eller IgG: $\geq 4x$ stigning
Mulig aktuell infeksjon
IgG: $\geq 512$
Antatt tidligere gjennomgått infeksjon
IgG: $\geq 16$ - $\leq 512$
Kvalitetskontroll
Bruk positiv og negativ kontroll hver gang.

Det finnes flere vanskeligheter i forbindelse med chlamydiaserologi (Tabell) (Peeling 2000; Boman 2002). Imidlertid fant man i en stor internasjonal sammenligning av resultater mellom 13 laboratorier at overensstemmelsen med referansestandarder var 80%.

**Tabell 4. Enkelte problemer med chlamydiaserologi**

• Dyrkningspositivitet uten serokonversjon
• Dyrknings- og PCR-negativitet med serokonversjon
• Flere antigener i kommersiell bruk AR-39, TW-183, Kajaani 6, MRL
• Kryssreaksjoner <i>m/Bartonella</i> , <i>Bordetella</i> , <i>E. coli</i> HSP60/65

#### 2.4.4 EIA

Rekombinant ELISA måler IgM, IgG og IgA. EIA måler antistoff rettet mot enkelte chlamydiaantigener, LPS eller MOMP. Enkelte kommersielt tilgjengelige EIA tester anvender en chlamydiaspesifikk rekombinant fragment av lipopolysakkarid, 3-deoksy-D-manno-2-octulopyranosid syre, som viser mindre kryssreaksjon med andre gramnegative mikrober (Brade 1997). EIA kit basert på et enkelt chlamydiaantigen kan gi falske negative resultater. På grunn av at en heterogen immunrespons mot chlamydia har vært dokumentert blant forskjellige individer. På den annen side kan bredt reagerende antigener fange opp flere aktuelle infeksjoner. En sammenlignende studie av 11 forskjellige tester ga følgende resultater:

**Tabell 5. Spesifisitet og sensitivitet av forskjellige tester for *C. pneumoniae* IgG antistoff (Hermann 2002)**

Test	Spesifisitet (%)	Sensitivitet (%)
<i>ELISA</i>		
Elegance	100	58
Immunocomb	98	65
Vircell	98	76
SeroCP	98	96
Quant	98	92
Labsystems	95	74
rELISA	88	42
<i>MIF</i>		
Vircell	100	66
MRL	100	100
SeroFIA	97	96
Labsystems	98	100

Sensitivitet og prediktiv verdi er sikkert avhengig av når prøven tas og hvilken metode som brukes ved ulike tidspunkter i sykdomsforløpet.

### 2.4.5 Konklusjoner

Laboratoriene bør tilby antistoffundersøkelse - MIF på regionnivå - og en nukleinsyre amplifikasjonsteknikk ved utredning av luftveisinfeksjon hvor *C pneumoniae* mistenkes. Det finnes et tidlig "vindu" hvor direkte påvisning fungerer bra og et tidspunkt senere hvor antistoffpåvisning er best og amplifikasjon er mer usikker.

### 2.4.6 Litteratur

1. Boman J, Hammerschlag M. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: Critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 1-20.
2. Boman J, Allard A, Persson K, Lundborg M, Juto P, Wadell G. Rapid diagnosis of respiratory *Chlamydomphila pneumoniae* infection by nested touchdown polymerase chain reaction compared with culture and antigen detection by EIA. J Infect Dis 1997; 175: 1523-6.
3. Brade H, Brabetz W, Brade L, Holst O, Löbau S, Lucakova M, Mamat U, Rozalski A, Zych K, Kosma P. Chlamydial lipopolysaccharide. J Endotoxin Research 1997; 67-84.
4. Csángó PA, Haraldstad S, Pedersen JE, Jagars G, Førelund I. Respiratory tract infection due to *Chlamydia pneumoniae* in military personnel. Scand J Infect Dis 1994; Suppl 104: 26-9.
5. Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM, Fields BS, Guarner J, Hammerschlag MR, Jackson LA, Kuo C-C, Maass M, Messmer TO, Talkington DF, Tondella ML, Zaki SR and the *C pneumoniae* Workshop participants. Clinical Infectious Diseases 2001; 33: 492-503.
6. Mahony JB, Coombes BK, Chernesky MA. *Chlamydia* and *Chlamydomphila*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White H. Manual of Clinical Microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Washington, D.C.: ASM Press 2003. p. 991-1004.

7. Falck G, Gnarpe J, Hansson LO, Svardssudd K, Gnarpe H. Comparison of individuals with and without specific IgA antibodies to *Chlamydia pneumoniae*: respiratory morbidity and the metabolic syndrome. *Chest* 2002; 122: 1587-93.
8. Hermann C, Graf K, Groh A, Straube E, Hartung T. Comparison of eleven commercial tests for Chlamydia specific immunoglobulin G in asymptomatic healthy individuals. *J Clin Microbiol* 2002; 1603-9.
9. Huittinen T, Leinonen M, Tenkanen L, Virkkunen H, Manttari M, Palosuo T, Manninen V, Saikku P. Synergistic effect of persistent *Chlamydia pneumoniae* infection, autoimmunity and inflammation on coronary risk. *Circulation* 2003; 107: 2566-70.
10. Lieberman D, Ben-Yaakov M, Lazarovich Z, Ohana B, Boldur I. *Chlamydia pneumoniae* infection in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: analysis of 250 hospitalizations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 698-704.
11. Pieniazek P, Stepień E, Sadowski J, Przewlocki T, Sokolowski A, Podolec P, Kapelak B, Przybyłowski P, Kadzielski A, Tracz W. Impact of *Chlamydia pneumoniae* infection on survival rate after heart transplantation. *Med Sci Monit* 2003; 9: CR: 67-72.
12. Wang S-p. The microimmunofluorescence test for *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Infect Dis* 2000; 18 (Suppl 3) S421-5.
13. Wong BY, Gnarpe J, Teo KK, Ohman EM, Prosser C, Gibler WB, Langer A, Chang WC, Armstrong PW. Does chronic *Chlamydia pneumoniae* infection increase the risk of myocardial injury? *Am Heart J* 2002; 144: 987-94.
14. Wolf SC, Mayer O, Jurgens S, Vonthein R, Schultze G, Risler T, Brehm BR. *Chlamydia pneumoniae* IgA seropositivity is associated with increased risk for atherosclerotic vascular disease, myocardial infarction and stroke in dialysis patients. *Clin Nephrol* 2003; 59: 273-9.

## 2.5 Kikhoste - agenspåvisning

Turid Mannsåker, Mikrobiologisk avdeling, Ullevål universitetssykehus

### 2.5.1 Innledning

Bakterien *Bordetella pertussis* ble første gang isolert i 1906. I 1949 ble det rapportert 48 660 kikhostetilfeller med 80 dødsfall. I 1952 ble vaksine innført i barnevaksinasjonsprogrammet. Dette forårsaket dramatisk nedgang i antall meldte tilfeller av sykdom hos små barn. I løpet av de siste tretti år har det forekommet bare et fåtall med dødelig utgang; fire dødsfall fordelt på årene 1973, 1995, 1997 og 2003.

I 1975 ble kikhoste summarisk meldepliktig, og fra 1983 ble kikhoste hos barn under 2 år nominativt meldepliktig. Fra 1993 er kikhoste i alle aldersgrupper nominativt meldepliktig. Siden 1997 har det i Norge vært en kontinuerlig kikhosteepidemi som pågår fortsatt.

Kriterier for meldeplikt er påvisning av bakterien *eller* klinisk diagnose med påvisning av sikre antistofftitre *eller* mistenkte kliniske tilfeller med serologi som støtte uten sikker bekreftelse.

I perioden 1993 – 96 var bare 18 % av meldte tilfeller i Norge påvist eller bekreftet med dyrkning. I de senere år har bruk av molekylærbiologiske metoder for agenspåvisning gitt muligheter for økt sensitivitet og hurtigere diagnostikk. Dette har gjort at FAT (fluorescerende antistoff-test), som har vist lite tilfredsstillende sensitivitet og spesifisitet, er blitt mindre aktuelt. Dyrkning vil fortsatt spille en betydelig rolle i kikhostediagnostikk på landsbasis og må opprettholdes av hensyn til den epidemiologiske og resistensmessige overvåking.

Visse problemområder peker seg ut i forbindelse med påvisning av *B. pertussis*-bakterier i prøver fra luftveiene.

### 2.5.2 Indikasjon for agenspåvisning

Nødvendigheten av en aktiv og god kikhostediagnostikk er begrunnet i forebygging av smitte som kan medføre alvorlig sykdom hos uvaksinerte småbarn. Ethvert mistenkt tilfelle av kikhoste bør søkes bekreftet med mikrobiologisk diagnostikk, hvilket bør innebære agenspåvisning dersom det er tidlig i sykdomsforløpet. Ofte vekkes mistanke først sent i forløpet fordi det hos vaksinerte småbarn, større barn og voksne, men også hos 25–30% av uvaksinerte mindre barn, kan sees et uspesifikt klinisk bilde med langvarig hoste som eneste symptom. Dette er viktig å være klar over fordi disse gruppene representerer det skjulte reservoar av kikhostesmitte i befolkningen. Det er viktig å spørre etter kontakt med erkjent kikhostetilfelle.

## 2.5.3 Prøvetaking

### 2.5.3.1 Prøvetakingstidspunkt

Prøvetakingstidspunkt relatert til sykdomsforløpet er av betydning for utfallet av forsøk på agenspåvisning. Sensitivitet for både dyrkning og PCR synker etter de første to uker etter sykdomsdebut. Etter 4 uker er påvisningsraten så lav at det ikke er regningsssvarende å forsøke agenspåvisning hvis det er mulig å få utført serologisk diagnostikk.

### 2.5.3.2 Materiale

Prøvematerialet må være tatt på rett måte. *B. pertussis* invaderer sylinderepitel og påvises derfor lettest i prøve fra nasopharynx og nedre luftveier. Prøvetaking fra nedre luftveier i form av BAL, kan forsvares bare hos AIDS-pasienter og andre med nedsatt immunforsvar. Aspirat fra nasopharynx tatt med sugekateter, gir bedre utbytte enn penselprøve ved dyrkning. Penselprøve fra nasopharynx er imidlertid standardrutine de fleste steder. Prøve fra svelg har vist seg å gi dårlig utbytte ved dyrkning, men noe bedre ved PCR.

Det er viktig å velge rett penseltype. Bomull kan virke hemmende på vekst av bordetellae. Calcium-alginat er bra for dyrkningsundersøkelse men er vist å kunne hemme ved PCR-påvisning. Dacron-pensel kan brukes til begge påvisningsmetoder. Skaftet på penselen må kunne formes og være lett bøyelig for innføring av penselen langs bunnen av nesehulen helt til den støter mot bakre svelgvegg hvor den roteres i noen sekunder før den trekkes forsiktig tilbake.

### 2.5.3.3 Prøvetransport

Det optimale for dyrkning er direkte utsed på spesialsål. I Norge blir *B. pertussis*-prøver undersøkt ved spesiallaboratorier og må sendes i adekvat transportmedium. Vanlig Amies transportmedium, med kull, og transport ved romtemperatur kan brukes dersom forsendelsen ikke tar stort mer enn ett døgn. Ved lengre transporttid er det vist å ha betydning at det benyttes anrikende og selektive spesialmedia. Med utgangspunkt i CHB-medium (se avsnitt om dyrkning) introduserte Regan & Lowe i 1977 halvflytende kullmedium med tilsetning av hesteblood og cefalexin som et egnet transportmedium. Dette er nå i utstrakt bruk. Det vil likevel kunne bli overvekst av cefalexin-resistent normalflora som vokser bedre enn bordetellae ved romtemperatur. Preinkubering i transportmediet før forsendelse (36grader i 1 – 2 dager) blir derfor anbefalt av noen. Dette kan sikre bordetellae for påvisning men vil også forsinke undersøkelsen og fremme vekst av normalflora. Nedkjøling av prøven vil kunne redusere antallet *B. pertussis* med >75 %. PCR er ikke avhengig av at bakterier overlever transport, og prøven kan sendes uten bakterietransportmedium dersom det ikke skal utføres dyrkning.

## 2.5.4 Dyrkning

Tidligere var Bordet-Gengou-mediet (BG) alminnelig anbefalt, og er fortsatt i bruk. Det inneholder potetekstrakt, er tilsatt glycerol og kaninblood og kan også tilsettes cefalexin. Ulempen er kort holdbarhet samt at *B. pertussis*-suspensjon fra dette mediet viser tendens til autoagglutinerings ved serologisk identifikasjon.

Oxoid introduserte i 1965 et kullmedium supplementert med defribinert hesteblood, CHB-medium (charcoal-horse blood) som økte sensitiviteten på dyrkningsundersøkelsen. For hemning av normalflora tilsettes cefalexin. Dette mediet har betydelig bedre holdbarhet enn BG-medium, 4 – 8 uker, og er i utstrakt bruk i dag, oftest under betegnelsen Regan-Lowe-medium. Cefalexin kan muligens hemme enkelte stammer av *B. pertussis*, men det er vist å ha så liten betydning at det ikke er nødvendig å så ut prøver på skåler med og uten cefalexin parallelt.

For å få økt utbytte av penselprøver som sendes på vanlig Amies transportmedium (med kull), er det anbefalt at penselen etter primærutsed settes over på rør med Regan-Lowe-medium hvoretter det utføres ny utsed på skåler etter 48 timer.

Optimal inkuberingsstemperatur for bordetellae er 35–36°C, og atmosfæren må være fuktig og uten CO<sub>2</sub>-anrikning.

### 2.5.5 Identifisering

Veksthastighet, kolonimorfologi, Gramfarging, oxidasereaksjon og slide agglutinasjon med spesifikke antisera må brukes for å identifisere *B. pertussis* og eventuelt differensiere fra cefalexinresistent normalflora og andre bordetellae. (*B. parapertussis* kolonier blir synlige etter 2–3 døgn, mens *B. pertussis*-kolonier blir synlige etter 3–4 døgn. *B. bronchoseptica*-kolonier ligner *B. pertussis* ved vekst på CHB-agar, men førstnevnte viser synlige kolonier allerede etter 24 timer. Ved subkultur vil *B. parapertussis* og *B. bronchoseptica* vokse på brunskål, i motsetning til *B. pertussis*. *B. parapertussis* er oxidase negativ, *B. pertussis* og *B. bronchoseptica* er oxidase positive. Ved Gramfarging er bordetellae gram-negative kokkobasiller, men kan under påvirkning av cefalexin bli mer stavformede. Det har vist seg nødvendig med serologisk verifisering ved identifikasjon av *B. pertussis*. Slide-agglutinasjon kan forstyrres av uspesifikk spontanagglutinasjon hvis bakteriesuspensjonen er laget fra vekst på medium med cefalexin.

### 2.5.6 PCR

PCR-metode for påvisning av *B. pertussis* har vært i bruk i flere år, men er fortsatt lite standardisert og finnes i mange ulike varianter av velfungerende in-house metoder. Inntil det er etablert et bedre kommersielt tilbud på pertussis-PCR bør metoden bare benyttes ved sentre som har kompetanse til å vurdere, prøve ut og kvalitetssikre aktuelle primere, reagenser, detaljer i praktisk utførelse samt tolkning av resultater. Situasjonen vil bli en annen når det etter hvert blir mer utbredt bruk av kommersielle kits for real-time-PCR i lukkede systemer. Dette vil gjøre hele metoden raskere og enklere å utføre, men vil fortsatt være kostbar. Prøvetaking for PCR: Penselprøve fra nasopharynx (dyp neseprøve) sendt i transportmedium for bakteriologisk dyrkning kan brukes. Det er imidlertid mer optimalt med transportmedium spesielt for PCR av respiratoriske agens, bestående av en bufferløsning. Prøven bør ikke utsettes for fryse-tining før den skal undersøkes i laboratoriet.



## 2.5.7 Dyrkning versus PCR

I perioden 2–4 uker etter sykdomsdebut blir en betydelig del av prøvene positive bare i PCR, bl.a. i tilfeller der det er påbegynt antibiotikabehandling. I en studie utført ved Ullevål universitetssykehus og Folkehelseinstituttet var 22% av prøver med påvist agens positive bare i PCR dersom prøven var tatt mindre enn 2 uker etter sykdomsdebut. Denne andelen steg til 37% i perioden 2–4 uker etter sykdomsdebut, og til 60% senere enn 4 uker.

Dyrknings-metoden er for lite sensitiv til å kunne brukes som gullstandard for å beregne spesifisitet av de ulike PCR-variantene. Det er i gjentatte studier vist at PCR er langt mer sensitiv enn dyrkning hvis metoden relateres til infeksjoner som kan bekreftes også med serologi, kliniske funn og/eller epidemiologisk sammenheng. Spesifisiteten er nå vist å være svært høy (95–100%) når laboratoriene følger anbefalte retningslinjer for utførelse av PCR. Men PCR-utførelse krever nitid nøyaktighet, kompetent personell og kostbart utstyr, og metoden kan innebære en kostnadsøkning for *B. pertussis*-påvisning på minst 30% i forhold til dyrkning.

## 2.5.8 Anbefalinger

- ◆ Agenspåvisning bør alltid forsøkes ved mistanke om kikhoste og < 4 ukers sykehistorie. Særlig viktig dersom små (ikke fullvaksinerte) barn i nære omgivelser.
- ◆ Prøve tatt fra bronchiene er mest optimalt, bør gjennomføres hos immunkompromiterte.
- ◆ Prøve tas ellers fra nasopharynx for dyrkning, nasopharynx eller hals for PCR.
- ◆ Prøvetakingsutstyr
- ◆ Dacronpensel i bakterietransportmedium m/kull (for dyrkning / PCR)
- ◆ Evt. spesialmedium for PCR mhp respiratoriske agens
- ◆ Påvisningsmetode
  - ◆ Dyrkning vil diagnostisere de fleste i tidlig sykdomsfase.
  - ◆ PCR bør foretrekkes i perioden 2 - 4 uker ut i sykdomsforløpet.
  - ◆ PCR bør kunne tilbys av alle laboratorier som har nødvendig kompetanse og et visst prøvevolum. Kan realiseres ved økt tilgang på kommersielle kits for real-time-PCR.

## 2.5.9 Litteratur

1. Manual of Clinical Microbiology ASM Press, 7<sup>th</sup> edition, ed. P.Murray et al. 2001, 614-24.
2. MSIS, Meldingssystem for smittsomme sykdommer 1996; 43, 1999; 41, 2000; 37, 2002; 48, 2003; 14.
3. Procedures in Clinical Microbiology ASM Press
4. Holberg-Petersen et al. Experience with PCR, culture and serology for detection of *Bordetella pertussis*. Ikke publisert.
5. Farrel, D.J. et al. Nested Duplex PCR To Detect *Bordetella pertussis* and Its Application in Diagnosis of Pertussis in Nonmetropolitan Southeast Queensland, Australia. J Clin Microbiol. 1999; 606-10.
6. Cloud JL, Hymas W and Carroll KC. Impact of Nasopharyngeal Swab Types on Detection of *Bordetella pertussis* by PCR and Culture. J Clin Microbiol. 2002; 3838-40.
7. Lievano FA et al. Issues Associated with and Recommendations for Using PCR to Detect Outbreaks of Pertussis. J Clin Microbiol. 2002; 2801-5.
8. Heininger U et al. Clinical Validation of a Polymerase Chain Reaction Assay for the Diagnosis of Pertussis by Comparison With Serology, Culture, and Symptoms During a Large Pertussis Vaccine Efficacy Trial. Pediatrics. 2000; 105: 31-.

## **2.6 Kikhoste - antistoffpåvisning**

Pål A. Jenum, Mikrobiologisk seksjon, Sentrallaboratoriet, Sykehuset Asker og Bærum

### **2.6.1 Innledning**

Det henvises til innledningen under agenspåvisning.

Rundt 80 % av meldte kikhostetilfelle er basert på serologiske funn. En hovedgrunn til dette er sannsynligvis at kikhoste først mistenkes når hosten har vedvart noen tid og prøver med tanke på diagnose tas en stund ut i forløpet. Tidligst etter 2 uker er mulig å diagnostisere kikhoste på basis av analyse av spesifikke antistoff, og ofte må det gå lenger tid før serokonversjon, signifikant verdistigning eller diagnostisk høyt verdier kan påvises. Hovedspørsmålene omkring serologisk diagnostikk av kikhoste er for det første knyttet til valg av testsystem, siden ulike produkter er basert på ulike antigener, og på påvisning av ulike immunglobulinklasser. Hvilke kombinasjoner egner seg best - det vil si gir den beste diagnostiske sensitivitet og spesifisitet? For det andre er valg av kriterier for å stille en positiv diagnose avgjørende, spesielt når diagnosen baseres på høy verdi i en enkeltprøve og/eller stasjonært høye verdier. Dette kompliseres ytterligere dersom man benytter et sett av ulike tester, med tilsvarende mulig variasjon i ulike resultatkombinasjoner.

### **2.6.2 Indikasjon for antistoffpåvisning**

Det henvises til indikasjonskapitlet under agenspåvisning.

Kikhoste er en sykdom som har ”vent tilbake” i de senere år. Dette illustreres ved epidemien i 1997-98 og den påfølgende tid med et høyere endemisk nivå og nye, mindre utbrudd. Dette betyr at det er indikasjon for kikhostediagnostikk ved hoste generelt, ikke bare ved vedvarende hoste over tid og at denne diagnostikken bør inngå som et fast element i utredningen av hoste.

### **2.6.3 Prøvetaking**

#### **2.6.3.1 Prøvetakingstidspunkt**

Når det gjelder antistoffanalyser som diagnostisk hjelpemiddel er enkeltprøver tatt innen 2 uker etter sykdomsdebut, isolert sett uten verdi. En slik prøve kan imidlertid være avgjørende som sammenligningsgrunnlag for en oppfølgingsprøve for å stille diagnosen siden serokonversjon eller signifikant verdistigning kan påvises også i mange tilfelle hvor resultatnivået i oppfølgingsprøven alene ikke er diagnostisk tilstrekkelig. Det bør derfor oppfordres til å ta en ”0-prøve” ved hoste av mindre varighet enn 2 uker. Selv om det også tas prøve for agenspåvisning på dette tidspunkt vil serumprøve være nyttig supplement siden agenspåvisning kan gi falskt negativt resultat.

For øvrig vil enkeltprøver tatt etter 2 ukers sykdomsvarighet kunne gi holdepunkt for kikhoste. Ved lave verdier eller negative resultater i denne prøven vil man be om kontrollprøve etter 1-2 uker for å kunne påvise eventuell endring i verdi. Ved lave eller negative verdier i prøve tatt mer enn 4-6 uker etter sykdomsdebut har imidlertid kontrollprøve liten eller ingen hensikt siden ytterligere stigning knapt kan ventes etter dette.

### 2.6.3.2 Prøvematerialet og transport

Serum benyttes, fra fullblod eller fullblod med gel. Om plasma kan benyttes må fremgå av testsystemets produktbeskrivelse. Transporteres som vanlig serumprøve med korrekt emballering og merking (hylse, konvolutt merket ”Biologisk materiale”).

## 2.6.4 Valg av tester

### 2.6.4.1 Antigener

*B. pertussis* er utstyrt med mange antigener, både strukturelle og exoantigener som er av betydning for virulens, individuell immunrespons og serologisk diagnostikk. De viktigste for serologisk diagnostikk er pertussis toksin (PT) og filamentøst hemagglutinin (FHA). Et annet antigen som inngår i enkelte acellulære vaksiner, er pertactin, men antistoff mot dette er ikke like godt egnet i diagnostisk sammenheng (1). Blant øvrige antigener kan nevnes agglutinogener (bl.a. varmelabile K-antigener knyttet til fimbrier) som også inngår i enkelte acellulære vaksiner og er av betydning for serotyping, O-antigener (LPS), adenyl-cyklase toksin (ACT), dermonekrotisk toksin (DNT), trakealt cytotoxin (TCT), varmelabilt toksin (HLT)(2). Fordelen ved bruk av PT og FHA i serologisk diagnostikk er at de er kraftige antigener som så å si alle eksponerte danner målbare antistoffer mot (3). PT er spesifikt for *B. pertussis*, mens FHA-antistoffer kryssreagerer med antistoff mot lignende antigener i enkelte andre bakterier, for eksempel *B. parapertussis* og *H. influenzae*. Det er likevel anført at FHA-antistoff er diagnostisk viktig ved kikhoste, spesielt hos vaksinerte, siden sensitiviteten ved PT-antistoffundersøkelse for slike pasienter er noe lavere enn for uvaksinerte.

Helcelleantigen til bruk i serologisk diagnostikk er forbundet med stor usikkerhet hva gjelder kryssreaksjoner (3). Det anbefales derfor at det benyttes tester med rensede antigener (4). Ved serokonversjon eller sterkt positivt utslag vil man ikke vite hvilket av de tilstedeværende testantigenene responsen er rettet mot. Serodiagnostikken bør derfor omfatte spesifikt antigen, i praksis PT.

### 2.6.4.2 Immunglobuliner

Pertussis er en slimhinneinfeksjon og induserer derfor sekretorisk IgA i tillegg til serumantistoffer av klasse A, G og M. Påvisningen av serum IgG-antistoff danner basis i diagnostikken. Det eksisterer så vidt vites ingen kommersiell test for påvisning av pertussis-

antistoff i spytt eller ekspektorat (5). Spesifikke IgM antistoff er vist å kunne bestå i lang tid etter infeksjon og er derfor et mindre godt mål på aktuell infeksjon. IgA-antistoff er vist å være mer spesifikke og bedre assosiert med aktuell sykdom enn IgM og bør derfor foretrekkes i valget mellom disse (6). Enkelte kommersielle tester detekterer både IgG, IgA og IgM separat. Det er ikke sikkert vist at dette bedrer diagnostikken hva gjelder kombinasjon av sensitivitet og spesifisitet. Jo flere analyseresultater som trekkes inn i kriteriene for å stille en diagnose desto mer komplisert blir tolkningen.

### 2.6.4.3 Diagnostiske kriterier

De enkelte kommersielle tester har definert hvilke kriterier som skal være oppfylt for at resultatet skal kunne tas til inntekt for en aktuell diagnose. Siden testene baseres på ulike antigener og immunglobuliner vil konklusjonene gjøre at samme serum eller serumpar kan gi ulike konklusjoner når de testes i ulike testsystemer (7,8). Både en overdiagnostisering og en underdiagnostisering er uheldig i den pasientrettede diagnostikken. Og uansett hvilket testsystem som er mest riktig, er ulikheter uheldig i overvåkningssammenheng.

Også dagens kikhostevaksine kan gi målbare og til dels høye antistoffmengder mot vaksinens antigener. De målte verdiene av antistoff må derfor vurderes mot vaksinasjonsstatus og tid siden siste vaksine og dette vil igjen være avhengig av pasientens alder (9). Individuer vaksinert med tidligere helcellevaksine gir ikke antistoffutslag som følge av vaksinen.

**Tabell      Andel (%) med antistoff verdistigning blant 90 pasienter med dyrkningsbekreftet kikhosteinfeksjon (10)**

	FHA	PT	FHA eller PT
Ikke-immuniserte (n=74)			
IgG	84	96	99
IgM	34	36	
IgA	45	53	
IgG eller IgA	88	96	100
Immuniserte (n=16)			
IgG	81	75	94
IgM	19	13	
IgA	88	31	
IgG eller IgA	100	75	100
Totalt (n=90)			
IgG	83	92	98
IgG eller IgA	90	92	100

Følgende kriterier kan være veiledende for aktuell serologisk diagnose av kliniske symptomer forenlige med *B. pertussis*-infeksjon (nylig vaksinasjon utelukket). Rådene er

primært basert på Pertusscan 2+2 testen med tilhørende dokumentasjon (3,4,10). Diagnostisk sensitivitet er avhengig av når i forløpet prøvene tas.

#### 2.6.4.4 Serumpar

Serokonversjon eller sikker verdistigning

Vurdering av hva som er sikker verdistigning forutsetter at man kjenner testens usikkerhet gjennom bruk av kituavhengige kontroller

for IgG mot spesifikt antigen, i praksis PT  
De fleste vil samtidig ha stigning mot FHA. Sikker diagnose

for FHA IgG dersom pasienten er over 60 år  
Disse pasientene responderer dårligere mot PT Sannsynlig diagnose

#### 2.6.4.5 Enkeltserum

Moderat/høy PT IgG ( $>3x$  co) og PT-IgA positiv ( $>co$ ) Sikker diagnose

Dersom uvaksinert barn:

Moderat/høy PT-IgG alene tilstrekkelig Sikker diagnose

Høy PT IgG ( $>6x$  cut-off)

og

høy FHA IgG ( $>3x$  co) og høy FHA IgA ( $>2x$  co) Sikker diagnose

Høy PT IgG ( $>6x$  co)

og

Moderat FHA IgG (2-3x co) og positiv FHA-IgA ( $>co$ ) Sannsynlig diagnose

Moderat PT IgG (3-6x co)

og

Høy FHA IgG ( $>3x$  co) og høy FHA IgA ( $>2x$  co) Sannsynlig diagnose

## 2.6.5 Oppsummering

- Antistoffpåvisning er nødvendig del av kikhostediagnostikken.
- Serologiske analyser kan gi bekreftende svar tidligst etter 2 uker etter sykdomsdebut.
- Sammenlignende "0-prøve" tatt de første 2 uker øker muligheten for å stille diagnosen.
- Det bør benyttes en test som baseres på spesifikke antigener, minimum pertussistoxin.
- Spesifikt IgG er viktigste immunoglobulinklasse.
- Spesifikt IgA gir bedre tilleggsinformasjon enn IgM, som er dårligere egnet.
- Det bør benyttes sammenlignbare serologiske kriterier for definisjon av pertussis
- Testen er egnet for fylkeslaboratorier

## 2.6.6 Litteratur

1. Trollfors B, Lagergård T, Gunnarsson E, Taranger J. Determination of pertactin IgG antibodies for the diagnosis of pertussis. *Clin Med Infect* 2003, 9, 585-9.
2. Storsaeter J. Studies on the protective efficacy of two acellular pertussis vaccines. The importance of appropriate diagnostic methods and case definitions. Thesis. Stockholm 1991.
3. Kösters K, Riffelmann M, Dohrn B, Wirsing von König CH. Comparison of five commercial enzyme immunosorbent assays for detection of antibodies to *Bordetella pertussis*. *Clin Diag Lab Immunol* 2000, 7, 422-6
4. Hoppe JE. Update on epidemiology, diagnosis and treatment of pertussis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996, 15, 189-93.
5. Granström G, Askelöf P, Granström M. Specific immunoglobulin A to *Bordetella pertussis* antigens in mucosal secretion for rapid diagnosis of whooping cough. *J Clin Microbiol* 1988, 26, 869-74.
6. Thomas MG, Ashworth LAE, Miller E, Lambert HP. Serum IgG, IgA, and IgM responses to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and agglutinogens 2 and 3 after infection with *Bordetella pertussis* and immunization with whole-cell pertussis vaccine. *J Infect Dis* 1989, 160, 838-45.
7. Trollfors B, Taranger J, Lagergård T et al. Serum IgG antibody responses to pertussis toxin and filamentous haemagglutinin in nonvaccinated and vaccinated children and adults with pertussis. *Clin Infect Dis* 1999, 28, 552-9.
8. Isacson J, Trollfors B, Hedvall G, Taranger J, Zackrisson G. Response and decline of serum IgG antibodies to pertussis toxin, filamentous haemagglutinin and pertactin in children with pertussis. *Scand J Infect Dis* 1995, 27, 273-7.
9. DeMelker HE, Versteegh FGA, Conyn-van Spaendonck MAE, Elvers LH, Berbers GAM, Van der Zee A, Schellekens JFP. Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G in antibodies against pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 2000, 38, 800-6.
10. Granström G, Wretling B, Salenstedt CR, Granström M. Evaluation of serologic assays for diagnosis of whooping cough. *J Clin Microbiol* 1988, 26, 1818-23

## 2.7 Legionella - agenspåvisning

Olav B. Natås, Avdeling for medisinsk mikrobiologi, Sentralsjukehuset i Rogaland

### 2.7.1 Innledning

Legionella finnes i ferskvann. De formerer seg intracellulært i protozoer, oftest amøber, ved temperaturer mellom 25 og 42°C (1,2). Personer som inhalerer aerosoler eller aspirerer vann som inneholder Legionella kan få legionellose. De fleste legionellose skyldes smitte fra menneskeskapt vannsystemer som kjøletårn, boblebad, vannledninger, befuktere, vanntanker, m.m. En skiller mellom legionærsykdommen som er en alvorlig pneumoni med multi-organpåvirkning, og Pontiac feber som er en godartet infeksjon med influensaliknende symptomer (1,3,4). En kjenner til 48 legionellaarter og ca halvparten av disse er påvist å gi infeksjon hos mennesker. Flere av legionellaartene kan inndeles i serogrupper (Tabell 1).

**Tabell 1. Legionellaarter og serogrupper som er påvist å gi infeksjon hos mennesker**

	<u>Art</u>	<u>Antall serogrupper</u>
1.	<i>L. pneumophila</i>	15
2.	<i>L. bozemanii</i>	2
3	<i>L. dumoffii</i>	1
4.	<i>L. micdadei</i>	1
5	<i>L. longbeachae</i>	2
6.	<i>L. jordanis</i>	1
7.	<i>L. wadsworthii</i>	1
8.	<i>L. hackeliae</i>	2
9.	<i>L. feeleeii</i>	2
10.	<i>L. maceachernii</i>	1
11.	<i>L. birminghamensis</i>	1
12.	<i>L. cincinnatiensis</i>	1
13.	<i>L. gormanii</i>	2
14.	<i>L. sainthelensi</i>	2
15.	<i>L. tucsonensis</i>	1
16.	<i>L. anisa</i>	1
17.	<i>L. langsingensis</i>	1
18.	<i>L. erythra</i>	2
19.	<i>L. parisiensis</i>	1
20.	<i>L. oakridgensis</i>	1

Modifisert etter (1)

De 5 første artene i tabell 1 diagnostiseres oftest. *L. pneumophila* er årsak til ca. 90% av rapporterte legionellose (1,5). Tallet er trolig for høyt da de fleste testene diagnostiserer kun *L. pneumophila*. Andre legionellaarter finnes hyppigere ved nosokomiale infeksjoner enn ved reiserelaterte og sporadiske infeksjoner (6).

*L. pneumophila* serogruppe 1 utgjør 80% av alle *L. pneumophila* infeksjonene (1).

Serogruppe 1 kan inndeles i flere subgrupper ved hjelp av monoklonale antistoffer (7). I tillegg til Legionella finnes flere "legionella liknende amøbale patogener", LLAP (8). Disse bakteriene kan ikke dyrkes på kunstige medier men kan dyrkes i amøbekultur. En LLAP har vært isolert i amøbekultur fra en pasient med pneumoni. Legionellainfeksjoner er

underdiagnostiserte. Infeksjonene lar seg ikke skille klinisk fra andre infeksjoner. God mikrobiologisk diagnostikk er viktig for å gi hurtig og effektiv behandling og øke overlevelsen hos pasientene.

## 2.7.2 Diagnostikk

Legionærsykdommen diagnostiseres vanligvis ved påvisning av Legionella antigen i urin og ved dyrkning av legionellabakterier fra luftveissekret. Immunfluorescens i luftveissekret og PCR fra luftveissekret, serum og urin kan anvendes i tillegg for de som har erfaring med disse metodikkene. Pontiac feber diagnostiseres ved påvisning av antistoff i serum (1).

### 2.7.2.1 Dyrkning

Dyrking er den mest spesifikke diagnostiske prosedyre og regnes som gullstandard. Sensitivitet er ca 60% (30-80%), spesifisitet nær 100%. (3). Ekspektorat, bronkialaspirat, bronkoalveolær lavage og lungebiopsi er velegnet prøvemateriale. Mange pasienter med legionærsykdommen produserer lite eller ikke ekspektorat. Det er viktig at prøve tas før pasienten får adekvat antibiotika. Luftveisprøver inneholder ofte lite pussceller og kan ikke bedømmes etter vanlige mikroskopiske kriterier for representativt prøvemateriale (9). Bakteriene overlever dårlig i luftveissekret og hurtig utsæd er derfor viktig (1). Legionella har i sjeldne tilfeller blitt isolert fra ekstrapulmonale steder som benmarg, hjerteklaffer, sår, peritoneum m.m.

Prøvene såes ut på BCYE agar (buffered charcoal yeast extract). Mediet inneholder aminosyren L-cystein som er nødvendig for vekst av *Legionella*. Treverdige jern og  $\alpha$ -ketoglutarat i mediet fremmer veksten. Ulike antibiotikakombinasjoner kan anvendes for å gjøre mediet selektivt. PAV supplement inneholder polymyxin, anisomycin og vancomycin mens PAC supplement inneholder polymyxin, anisomycin og cefamandol. *L. micdadei* hemmes av cefamandol. Skålene må inkuberes i fuktig miljø i vanlig atmosfære ved 37°C. Kolonier blir vanligvis synlige etter 2-3 dager. *L. pneumophila* har lysegrå kolonier med et blålig eller lysegrønt skinn (1). Andre legionellarter kan ha mer pigmenterte kolonier. I stereomikroskop og påfallende lys har unge kolonier "cut-glass" ("ground-glass") utseende. Koloniene såes om på BCYE agar med og uten L-cystein, eller på BCYE agar med L-cystein, sjokoladeagar og blodagar. Kolonier som bare vokser på BCYE agar med L-cystein konfirmeres som Legionella med serologiske tester, for eksempel agglutinasjonstest, eller sekvensering av 16S rRNA eller av mip (macrophage infectivity potentiator) gener (10). Kun et fåtall laboratorier har antisera mot alle artene. Legionella Latex Test fra OXOID har antiserum mot *L. pneumophila* serogruppe 1, antiserum mot *L. pneumophila* serogruppe 2-14, og et polyvalent antiserum mot artene *L. longbeachae*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei* og *L. anisa*. Prøver uten vekst besvares som negative etter 7 døgns inkubering.

Legionella er gram-negativ stavbakterier og farges svakt ved vanlig gram-farging. De er pleomorfe, slanke, med variabel lengde. De er katalase positive, oxidase variable og negative for nitratreduksjon og urease. De forgjærer ikke sukkerarter. *L. pneumophila*, unntatt serogruppe 4 og 15, er kraftig hippurat positive. Legionella er bevegelig. De fleste artene danner beta-laktamase.



Mange pasienter med legionærsykdom har bakteriemi. Ved bruk av automatiske blodkultur-systemer må daglig blindutsæd foretas da maskinen ikke gir beskjed om vekst (11).

Resistensbestemmelse er ikke standardisert og er ikke anbefalt i rutinediagnostikken (12). Legionella er følsom for fluorokinoloner og makrolidantibiotika. Vanlig brukte antibiotika er levofloxacin eller ciprofloxacin og/eller azitromycin eller klaritromycin (13).

### **2.7.2.2 Urin antigen test**

Morgenurin anbefales. Der finnes flere EIA tester og en immunkromatografisk test (Binax NOW). En del av bakteriens lipopolysakkarid utskilles i urinen og påvises i testene. Testene blir vanligvis positiv etter 2-3 dagers sykdom (14-16). Hos enkelte pasienter kan testen forbli positiv i flere måneder etter vellykket behandling (1, 10, 17). Binax NOW diagnostiserer *L. pneumophila* serogruppe 1. Sensitiviteten er ca 80%, spesifisiteten 97-100% (18). Sensitiviteten kan økes ved å konsentrere urinen og uten at dette går ut over spesifisiteten (19). Når alle legionellaarter tas med synker sensitiviteten til 60-70%. Biotest EIA hevder å diagnostisere flere legionellaarter, men omfanget av arter den kan diagnostisere er ikke avklart. Urin antigen test er den mest anvendte testen. Det er lett å skaffe prøvemateriale, testen er enkel og tar kun 15 minutter å utføre.

### **2.7.2.3 Immunfluorescens**

Monoklonale antistoffer mot *L. pneumophila* benyttes. Sensitiviteten er angitt til 25-75%, spesifisiteten 96-99% (1,2). Polyklonale sera gir for mange kryssreaksjoner mot andre mikrober og anbefales ikke brukt i diagnostikken (10). Testen kan benyttes flere dager etter at pasienten har fått antibiotika (1). Testen er mest egnet ved utbrudd av legionærsykdommen.

### **2.7.2.4 Polymerasekjedereaksjon**

Polymerasekjedereaksjon, PCR, har potensiale til å diagnostisere infeksjoner med alle legionellaarter (1). Testen har vært prøvd på luftveissekret, serum og urin, men har enda ikke funnet sin plass i rutinediagnostikken (20). Foreløpige resultater tyder på moderat sensitivitet 64-100% og høy spesifisitet 88-100% (2). PCR i urinen synes ikke på nåværende tidspunkt å øke sensitiviteten eller spesifisiteten sammenliknet med urin antigen tester (21).

## **2.7.3 Bruk av tester i rutinediagnostikken**

Alle mikrobiologiske avdelinger må utføre urin antigen test. Prøver til dyrkning bør alltid tas ved mistanke om legionellainfeksjon for å diagnostisere andre legionellaarter og serotyper enn *L. pneumophila* serogruppe 1. Dette er spesielt viktig ved mistanke om nosokomiale infeksjoner (6). Dyrkning er også viktig for å kunne sammenlikne isolater fra pasienter og miljøprøver ved utbrudd.

## 2.7.4 Miljøprøver

Rutinetesting av Legionella fra vanninstallasjoner er ikke anbefalt i Norge (22). Ved utbrudd er det en fordel at miljøprøver testes ved den mikrobiologiske avdeling som har pasientprøvene. Penselprøver fra biofilm og ½ liter vann dyrkes. Vannet filtreres og filteret dyrkes på BCYE agar med oversiden opp. Grovfiltrering må anvendes først hvis det er mye grums i vannet. Ved rik vekst av andre mikrober kan filteret etter filtrering behandles med syre før dyrkning (23). Til å sammenlikne isolater subgrupper *L. pneumophila* serogruppe 1. Det mest vanlige gruppesettet er ”Dresden panelet” sammen med monoklonalt antistoff 3 (MAb 3) til Joly et al. som kan subgruppe *L. pneumophila* serogruppe 1 i 15 phenoner (1,7). Flere metoder har vært benyttet til genotyping (24,25). AFLP (amplified fragment length polymorphism) er anbefalt av EWGLI (European working group on Legionella infection)(26,27). Subgruppering og genotyping bør utføres på spesiallaboratorium.

## 2.7.5 Litteratur

1. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires` disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 506-26.
2. Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, 8<sup>th</sup> edition, Ed.: Murray P et al. pp 809-23, 2003.
3. Glick TH, Gregg MB, Berman B, Mallison G, Rhodes Jr WW, Kassanoff I. Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department. I. Clinical and epidemiologic aspects. Am J Epidemiol 1978; 107: 149-60.
4. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GF, Martin SM, McDade JE, Shepard CC, Brachman PS. Legionnaires` disease: description of an epidemic of pneumonia. N Engl J Med 1977; 297: 1189-97.
5. Joseph C. 2002. Surveillance of Legionnaires` disease in Europe, pp. 311-7. In Marre R et al. (ed.), Legionella. ASM Press, Washington, D.C.
6. Helbig JH, Uldum SA, Bernander S, Lück PC, Wewalka G, Abraham B, Gaia V, Harrison TG. Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial Legionnaires` disease. J Clin Microbiol 2003; 41: 838-40.
7. Helbig JH, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, Gaia V, Lauwers S, Lindsay D, Lück PC, Marques T, Mentula S, Peeters MF, Pelaz C, Struelens M, Uldum SA, Wewalka G, Harrison TG. Pan-European study on culture-proven Legionnaires` disease: distribution of Legionella pneumophila serogroups and monoklonal subgroups. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21: 710-6.
8. Adeleke A, Pruckler J, Benson R, Rowbotham T, Halablab M, Fields B. Legionella-like amebal pathogens - phylogenetic status and possible role in respiratory disease. Emerg Infect Dis 1996; 2: 225-30.
9. Ingram JG, Plouffe JF. Danger of sputum purulence screens in culture of Legionella species. J Clin Microbiol 1994; 32: 209-10.
10. Maiwald M, Helbig JH, Lück PC. Laboratory methods for the diagnosis of Legionella infections. J Microbiol Methods 1998; 33: 59-79.
11. Rihs JD, Yu VL, Zuravleff JJ, Goetz A, Muder RR. Isolation of Legionella pneumophila from blood with the BACTEC system: a prospective study yielding positive results. J Clin Microbiol 1985; 22: 422-4.
12. Washington CW Jr. 1999. Legionella, pp. 572-85. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al. (ed.), Manual of clinical microbiology, 7<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

13. Edelstein PH. 2002. Chemotherapy of legionnaires` disease with macrolide or quinolone antimicrobial agents, pp. 183-8. In Marre R, Kwaik YA, Bartlett C, et al. (ed.), *Legionella*. ASM Press, Washington, D.C.
14. Stout, JE. Laboratory Diagnosis of Legionnaires` Disease: The expanding role of the Legionella urinary antigen test. *Clin Microbiol Newsletter* 2000; 22: 62-4.
15. Kashuba AD, Ballow CH. Legionella urinary antigen testing: potential impact on diagnosis and antibiotic therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 24: 129-39.
16. Kazandjian D, Chiew R, Gilbert GL. Rapid diagnosis of Legionella pneumophila serogroup 1 infection with the Binax enzyme immunoassay urinary antigen test. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 954-6.
17. Kohler RB, Winn WC JR, Wheat LJ. Onset and duration of urinary excretion in Legionnaires disease. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 605-7.
18. Helbig JH, Uldum SA, Lück PK, Harrison TG. Detection of Legionella pneumophila antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax Legionella urinary enzyme immunoassay (EIA) and Biotest Legionella urin antigen EIA. *J Med Microbiol* 2001; 50: 509-16.
19. Domínguez JA, Manterola JM, Blavia R, Sopena N, Belda FJ, Padilla E, Giménez M, Sabriá M, Morera J, Ausina V. Detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in nonconcentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2334-6.
20. Uldum SA, Mølbak K. 2002. PCR as a routine method for diagnosis of Legionnaires` disease, p. 213-5. In Marre R, Kwaik YA, Bartlett C, et al. (ed.), *Legionella*. ASM Press, Washington, D.C.
21. Helbig JH, Engelstädter T, Maiwald M, Uldum SA, Witzleb W, Lück PC. Diagnostic relevance of the detection of Legionella DNA in urine samples by the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 716-22.
22. Forebygging og kontroll av legionellasmitte fra VVS-anlegg. En veileder. Oslo: Nasjonalt Folkehelseinstitutt. In press.
23. ISO 11731. Draft 1998. Water quality – Detection and enumeration of Legionella. Part 2: Direkt membrane filtration method for waters with low bacterial counts.
24. Valsangiacomo CF, Baggi V, Gaia T, Balmelli R, Peduzzi R, Piffaretti JC. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of Legionella pneumophila and application to epidemiological studies. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1716-9.
25. Fry NK, Bangsburg JM, Bernander S, Etienne J, Forsblom B, Gaia V, Hasenberger P, Lindsay D, Papoutsi A, Pelaz C, Struelens M, Uldum SA, Visca P, Harrison TG. Assessment of intercentre reproducibility and epidemiological concordance of Legionella pneumophila serogroup 1 genotyping by amplified fragment length polymorphism analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 773-80.
26. Fry NK, Bangsborg JM, Bergmans A, Bernander S, Etienne J, Franzin L, Gaia V, Hasenberger P, Baladron Jimenez B, Jonas D, Lindsay D, Mentula S, Papoutsi S, Struelens M, Uldum SA, Visca P, Wannet W, Harrison TG. Designation of the European working group on Legionella infection (EWGLI) amplified fragment length polymorphism types of legionella pneumophila serogroup 1 and results of intercentre proficiency testing using a standard protocol. *Eur J Microbiol Infect Dis* 2002; 50: 509-16.
27. European Working Group on Legionella Infection: <http://www.ewgli.org/>

## 2.8 Legionella – antistoffpåvisning

Bjørn P Berdal, Forsvarets mikrobiologiske laboratorium, Oslo

### 2.8.1 Diagnostiske kriterier

I fravær av bakterier isolert fra lungene hos pasienter med mistanke om legionærsykdom, vil diagnostikken falle tilbake på EWGLIs diagnostiske kriterier (1998). Kriteriene sier at, dersom man i tillegg til de kliniske tegn, har

- fire-folds titerstigning mot *Legionella pneumophila* SG 1, kan det konkluderes med et confirmert kasus.
- fire-folds titerstigning mot en annen serogruppe av *L. pneumophila*, eller mot en annen *Legionella* species, blir dette konkludert med mistenkt ("presumptive") kasus.

### 2.8.2 Valg av antigen

Partikulært antigen har blitt benyttet til indirekte immunfluoreserende antistoff (indirekte IFA)- titering, eller også agglutinasjon i mikrotiterbrett. Forsøk på ELISA, med løselig antigen, har stort sett kommet dårlig ut.

Antigenkvaliteten er et problem. Både dyrkning (på agar) og stabilisering av et partikulært antigenpreparat gir lett opphav til ujevn kvalitet. Et annet kvalitetsproblem er at bakteriestammene bør resirkuleres på marsvin hvert 3-5 år, selv etter at primære isolater fra forsøksdyr er aliquotert ut og frosset i -80. Hvis ikke vil essensielle overflateantigen lett gå tapt.

### 2.8.3 Antistoffrespons

Antistoffsvaret kommer sent, etter 1-3 uker, og ofte med lavt titer, hvorfor det er fristende å si at

1. for *L. pneumophila* SG 1 sykdom, gir urin antigen påvisning (f eks Binax Now) en bedre konfirmasjon: svaret er sikrere, raskere, og kommer samtidig med at symptomene blir sterkere.
2. for andre *Legionella* serogrupeer, er utvalget av potensielle antigen så stort, at det kan reises tvil om antistofftitering basert på "standard" antigen virkelig er veien å gå. Denne vurderingen er gyldig selv der teknikken (indirekte IFA eller agglutinasjon) utføres med omfattende kvalitetskontroll og antigenet kan forventes å være representativt i det aktuelle geografiske området for smitte.
3. dersom det foreligger et mistenkt isolat, og man vil prøve serumpar fra pasienten mot akkurat det isolatet, blir serologien i ganske annerledes grad fokusert mot pasienten. Dette er en rosverdig fremgangsmåte, men tidkrevende fordi det må produseres nytt, individuelt antigen for hver pasient.

#### **2.8.4 Vyer**

En fremtidsvisjon kan være å kontrollere nosokomial smitte på intensivavdelinger ved at det fra ventilasjon eller varmtvann isoleres et lite utvalg av representative bakteriestammer. Det teoretiske utgangspunktet er at hver enkelt avdeling har en særegen og stabil bakteriepopulasjon. Fra isolatene produseres antigen, til bruk i f eks IFA eller agglutinasjon.

Deretter, ved mistanke om nosokomial smitte, vil titrering av et serumpar mot de lokale antigen være en vei som kan forsøkes. Andre lokaliseringer, f eks legionella isolert fra mistenkte kjøletårn, kan også være relevante i en slik forbindelse.

## 2.9 Atypiske mykobakterier

Tone Tønjum, Mikrobiologisk institutt, Rikshospitalet

### 2.9.1 Innledning

Atypiske mykobakterier er mykobakterier som ikke tilhører *Mycobacterium tuberculosis*-komplekset eller *M. leprae* (1). Funn av atypiske mykobakterier i luftveisprøver er ofte vanskelig å vurdere; som oftest avvises funnet som kolonisering eller miljøforurensning (2). Atypiske mykobakterier kan i noen tilfeller gi lungeinfeksjon hos immunkompetente individer (3). De kan dessuten kolonisere luftveiene uten å gi sykdom. På grunn av sin ubikvitære natur kan tilfelling påvisning eller forurensning med atypiske mykobakterier også forekomme (1). Det er vel kun klinisk registrert effekt av antimykobakteriell behandling som kan avgjøre om det virkelig er en kausal årsak mellom et funn av atypiske mykobakterier i klinisk prøvemateriale og en nedre luftveisinfeksjon.

Samtidig er prevalensen av atypiske mykobakterier blant kliniske mykobakterieisolater økende (2,4). Rapportert om human lungesykdom forbundet med atypiske mykobakterier, spesielt de som tilhører *M. avium*-komplekset, har også involvert verter som ikke har de tradisjonelle risikofaktorene som kjent lungesykdom eller tilstander som kan endre det lokale eller systemiske immunapparatet (3). Mer definitivt bevis som støtter et kausalt forhold mellom isolering av stammer tilhørende *M. avium*-komplekset og tilstedeværelsen av små perifere knuter med og uten fokale bronkiektasier finnes i biopsi-analyser og prospektive studier (3). Andre arter som kan gi et tuberkulose-lignende bilde er *M. kansasii*, *M. malmoense* og *M. intracellulare* (1). Begrepet ”luftveiskolonisering”, den ikke-patogene tilstedeværelsen av atypiske mykobakterier i luftveiene, kan derfor allikevel synes å være på vikende front. På grunn av den svært langsomme progresjonen av ikke-kavitær lungesykdom, blir dog det vedvarende spørsmålet om man skal være pågående og behandle pasienter med multiple og bredspektrede medikamenter, eller om man skal avvete og følge dem opp med hyppige mikrobiologiske tester, infeksjonsparametre og radiologiske undersøkelser.

### 2.9.2 Fremmarsjen av atypiske mykobakterier: Nye arter oppdages

Med gunstige dyrkningsbetingelser kombinert med molekylær klassifikasjon basert på 16S rDNA PCR-sekvensering oppdages stadig nye mykobakterie-arter (Tabell 1; Fig. 1) (4). Samtidig avfeies mange kliniske isolater med atypiske mykobakterier som forurensningsfunn (Tabell 2) (4). Diagnostikk av infeksjon med atypiske mykobakterier er ikke lett, siden de må skilles fra koloniserings- eller kontaminasjonsbakterier.

### 2.9.3 Molekylær mykobakteriediagnostikk

Molekylære metoder har mange fordeler over konvensjonell diagnostikk. Resultatene oppnås raskt, er pålitelige og reproducerbare, og selv blandingskulturer kan undersøkes. DNA-prober brukes i utstrakt grad av kliniske laboratorier for identifikasjon av de vanligste mykobakterieartene (4,7). Siden automatisert DNA sekvensering og sekvensanalyse har blitt så tilgjengelig, er PCR-basert DNA-sekvensering til identifikasjon av mykobakterier tatt i bruk av mange rutinelaboratorier for artsidentifikasjon. Signifikante fremskritt er gjort med disse

molekylære hjelpemidlene for mykobakteriediagnostikk. For fremtidig bruk representerer microarray-baserte teknikker store muligheter idet de er enkle å utføre, lett kan automatiseres og mange aktiviteter eller arter kan undersøkes i en enkelt reaksjon.

### **Tabell 1 De viktigste artene blant atypiske mykoakterier som kan gi luftveisinfeksjon**

#### **Hyppig involvert i luftveisinfeksjon**

##### Langsomtvoksende

- M. avium*-komplekset
- M. genavense*
- M. kansasii*
- M. malmoense*
- M. simiae*
- M. szulgai*
- M. xenopi*

##### Hurtigvoksende

- M. fortuitum*-gruppen (*M. fortuitum*, *M. peregrinum*)
- M. abscessus*
- M. chelonae*
- M. mucogenicum*

#### **Sjeldent forekommende / sjelden sykdomsårsak**

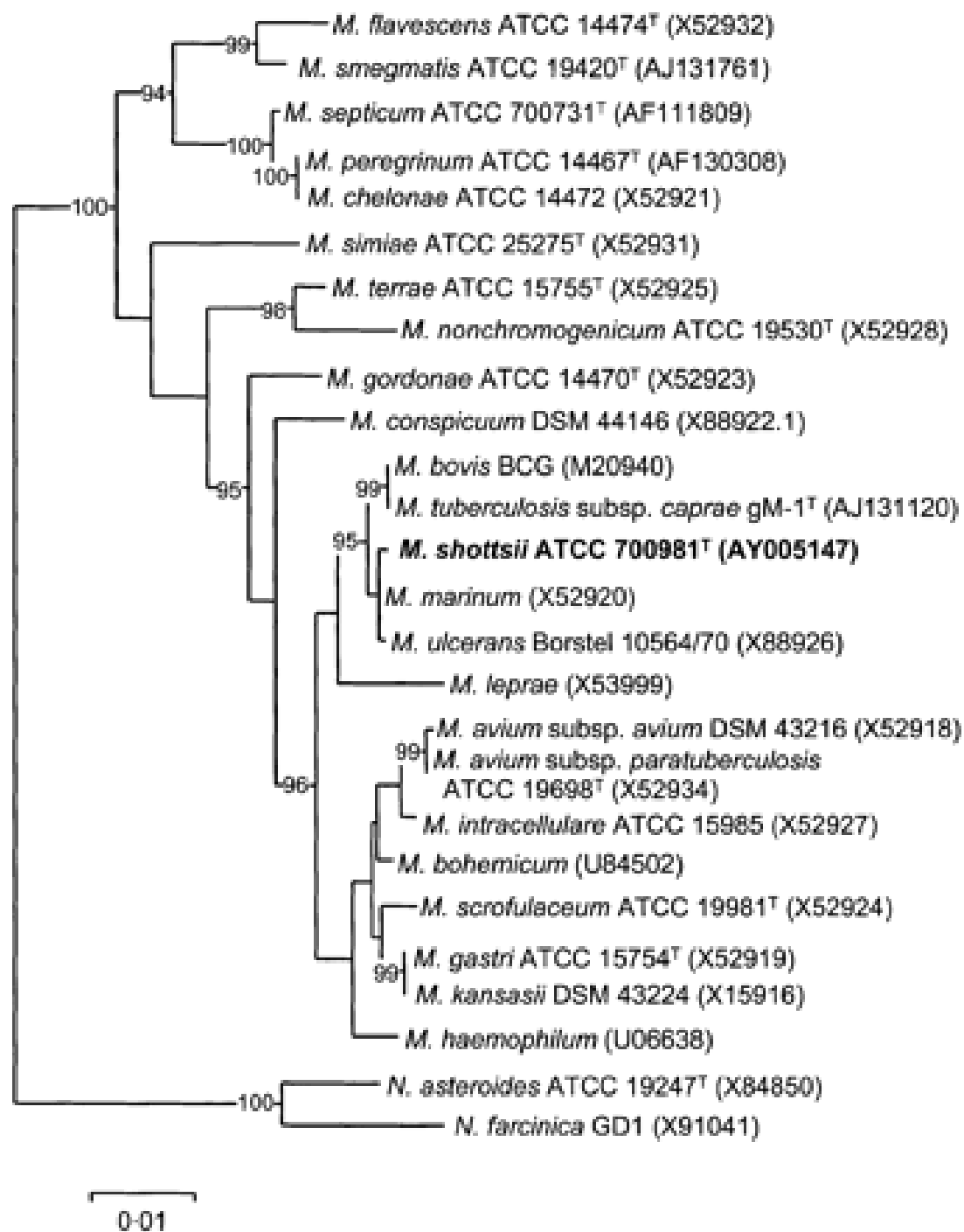
- M. asiaticum*
- M. bohemicum*
- M. branderi*
- M. conspicuum*
- M. celatum*
- M. gastri*
- M. gordonae*
- M. interjectum*
- M. intermedium*
- M. lentiflavum*
- M. scrofulaceum*
- M. shimoidei*
- M. terrae*-komplekset
- M. triplex*
- M. tusciae*

### **Tabell 2 De mest vanlige forurensning-mykobakterier**

- M. gordonae*
- M. phlei*
- M. smegmatis*

## Figur 1

Fylogenetisk kart over slekten *Mycobacterium* basert på 16S rDNA PCR-sekvensanalyse. Jukes–Cantor distanser er derivert fra DNA-sekvenser for å konstruere et optimalt fylogenetisk tre ved hjelp av neighbour-joining-metoden. Adaptert fra Rhodes et al. 2003 (11).





## 2.9.4 Byrden av uidentifiserbare mykobakteriearter i laboratoriene

Moderne genteknologi har i stor grad forbedret kunnskapen om mykobakterienes taksonomi (4). Sammen med nukleinsyresekvenser har mykobakterie-identifikasjonen vært velsignet med signifikansen av profileringen av lipidmønstrene av de unike mykolsyrene i disse bakteiene. Rutinebruk av high-performance liquid chromatography (HPLC) av mykolsyrer etterfulgt av sekvensering av 16S rDNA, bidrar i stor grad til å identifisere de aller fleste mykobakterie-isolater (4,8). Imidlertid opptrer stadig vekk nye mykobakterieisolater som ikke lar seg identifisere som en kjent artsrepresentant (4). De fleste slike isolater fra mennesker kommer fra luftveiene og anses derfor ofte ikke å være signifikante. Noen kommer imidlertid fra sterile områder (blod, pleurabiopsi, CVK, eller puss) og kan derfor ikke så lett avvises. Taksonomien av genus *Mycobacterium* synes derfor å være langt fra fullstendig belyst. Nye arter dukker stadig opp. Rapportering av uvanlige mykobakteriestammer er av stor verdi i denne sammenhengen.

## 2.9.5 Ikke-tuberkuløs mykobakteriell lungeinfeksjon ved cystisk fibrose

Siden 1990 har det kommet et økende antall rapporter om funn av atypiske mykobakterier fra de nedre luftveier hos pasienter med cystisk fibrose (CF) (5,6). Prospektive studier med screening av CF-pasienter antyder en prevalens på omtrent 13% (6). Årsaken til den økte forekomsten av atypiske mykobakterier hos CF-pasienter kan være flere:

- 1) aktiv leting etter agens
- 2) komplikasjoner pga. økt overlevelsestid, der flere mikrober kan gjøre seg gjeldende over tid
- 3) bedre dyrkningsmetoder
- 4) faktorer som faciliterer mykobakterie-overføring, som for eksempel vannforsyningen ved institusjoner
- 5) en mottakelig vert kan reflektere den økte forekomsten av atypiske mykobakterier ellers i befolkningen.

Det å skjelle luftveis-kolonisering fra infeksjon som kan bidra til progresjon av den underliggende sykdommen, kan ved CF være spesielt vanskelig. Behandling av atypiske mykobakterier hos CF-pasienter kan også være vanskelig pga. 1) endret medikamentabsorpsjon og metabolisme, 2) bredspektret behandling er ofte allerede ”oppbrukt”, og 3) følsomheten av andre patogener mot antimyko-bakterielle midler forstyrrer oppfølgingen av behandlingseffekten mot atypiske mykobakterier.

## 2.9.6 Predisposisjon overfor mykobakterieinfeksjoner: Betydningen av vertens genetiske profil

Vertens genetiske utrustning er avgjørende for dens mottakelighet overfor mykobakterier. Flere strategier er brukt for å avdekke hvilke determinanter og gener som er av betydning. Studier av en innavlet musestamme med økt tilbøyelighet for å få mykobakterie-, salmonella- og leishmania-infeksjoner ledet til identifikasjonen av genet som koder for Natural Resistance-Associated Macrophage Protein (Nramp1) (9). Senere studier hos mennesket har bekreftet betydning av Nramp1, og har også antydnet at major histocompatibility complex (MHC) og vitamin-D reseptor-gener kan være involvert i fastsetelsen av menneskets mottakelighet for mykobakterie-infeksjoner. Studiet av individer med økt følsomhet for BCG-

vaksinen har avdekket at også genene som koder for interferon gamma reseptor (IFN $\gamma$ R) ligand-bindende kjede, IFN $\gamma$ R signal-transduksjonskjede, IFN $\gamma$  signal-transduksjons-kjede og aktivering av transkripsjon-1, interleukin 12 reseptor beta1 subenheten og interleukin 12 p40 subenheten spiller en rolle. Genom-baserte linkage populasjonsstudier har vist at markører på kromosom 15 og X er involvert i økt tuberkulose-mottakelighet, og disse genene blir nå identifisert (9).

### **2.9.7 Atypiske mykobakterier som årsak til tentativ nedre luftveisinfeksjon – når skal man lete spesifikt etter atypiske mykobakterier?**

I tillegg til vanlige indikasjoner for å undersøke med hensyn på tuberkulose (langvarig feber, hoste, hemoptyse og avmagring), er pasienter som har i) tidligere lungesykdom, inkludert tuberkulose, ii) pågående lungesykdom inkludert bronkiektasier og cystisk fibrose, samt pasienter med iii) lokal eller systemisk immunsuppresjon og AIDS, de som i første rekke bør vurderes med hensyn på infeksjon med atypiske mykobakterier (3).

### **2.9.8 Prøvetaking ved mistanke om luftveisinfeksjon med atypiske mykobakterier**

Aktuelle prøvematerialer som bør tas er ekspektorat, larynksutstryk, trakealaspirat, bronkialaspirat, bronkioalveolar lavage (BAL), biopsi, magesekkaspirat og urin (1). Blodkulturer tas kun fra immunosupprimerte pasienter. Sterile beholdere må brukes. Unngå kontakt av prøvematerialet med springvann pga. den høye forekomsten av atypiske mykobakterier i vannmiljøer.

Ekspektorat i form av spontant eller indusert sputum er den vanligste prøven som tas for å påvise lungesykdom. Morgenekspektorat bør samles på tre på hverandre følgende dager. Ulike spyttprøver bør ikke samles i en beholder.

### **2.9.9 Oppfølging av positive funn: Når og hvordan?**

Oppfølgingsprøver tas ved etablert infeksjon fordi det er dyrkning, og ikke direkte mikroskopi eller PCR, som er den prøven som avgjør om kjemoterapi er effektiv. Det kan være vanskelig å få godt ekspektorat fra barn. I så fall kan man ta magesekk-/ventrikkelaspirat. BAL brukes mye ved sykehus og poliklinikker. Det er viktig med nøye rengjøring av bronkoskop mhp. mykobakterier for å unngå kryss-kontaminasjon.

### **2.9.10 Atypiske mykobakterier som ”bifunn” ved dyrkning med hensyn på *M. tuberculosis* – hva betyr et positivt funn?**

Det er vesentlig at funn av atypiske mykobakterier under jakten på *M. tuberculosis* blir vurdert, men med stor kritikk, slik at differensialdiagnostisk utredning på ingen måte blir forsinket.

### **2.9.11 Identifikasjon av atypiske mykobakterier**

Identifikasjon av atypiske mykobakterier (så vel som av vanskelig identifiserbare bakterier generelt) utføres ved 16S rDNA PCR-sekvensering ved en rekke sentrale laboratorier i Norge og Sverige. I Norge har Mikrobiologisk institutt, Rikshospitalet (8), og Mikrobiologisk avdeling, Ullevål sykehus (10), mest erfaring.

### **2.9.12 Hvilken plass har resistensbestemmelse?**

Resistensbestemmelse av atypiske mykobakterier er på sin plass kun etter konferanse mellom mikrobiolog og kliniker. De artene som oftest er aktuelle da er stammer som tilhører *M. avium*-komplekset, *M. kansasii* og *M. malmoense* (se for øvrig Tabell 1). Nasjonalt folkehelseinstitutt utfører resistensbestemmelse av atypiske mykobakterier. Medikamenter inkludert i analysen er claritromycin, amikacin, rifabutin, ciprofloxacin, ethambutol, ethambutol/ciprofloxacin og ethambutol/claritromycin. Hurtigvoksende mykobakterier kan resistensbestemmes ved bruk av E-tester, noe flere laboratorier har tatt i bruk

### **2.9.13 Behandling av infeksjoner med atypiske mykobakterier**

De nye makrolide-azid-antibiotika med demonstrert effekt mot *M. avium*-komplekset representerer en betydelig forbedring av utfallet av de ulike behandlingsregimene med multiple medikamenter som brukes. Selv om indikasjonen for behandling bør være klar og kritisk vurdert, forutsetter potensialet for forebygging av signifikant bronkiektatisk lungesykdom en pågående diagnostisk tilnærming for å identifisere atypiske mykobakterier i sine aktuelle kliniske presentasjonsformer. Gjenkjennelse av de ulike presentasjonsformene lungesykdom med atypiske mykobakterier kan gi en forutsetning for mistanke om atypiske mykobakterier som potensielle etiologiske agens ved nedre luftveisinfeksjon.

### **2.9.14 Konklusjon**

Selv om forekomsten av mykobakterier i kliniske materialer er i fremmarsj, viser flere studier at tilstedeværelsen av atypiske mykobakterier i ekspektorat og bronkialskyllvæske kan være et dårlig korrelat for infeksjon, og også kan medføre diagnostiske problemer og feilbehandling (3). Balansen mellom gevinsten ved sensitiv mykobakteriediagnostikk og overdiagnostisering er hårfinn. Selv om det er kjent at atypiske mykobakterier bør overveies i alle tilfeller der syrefaste staver er påvist ved mikroskopi, kan et slikt funn representere en felle i klinisk medisin og medføre både feilbehandling og forsinket påvisning av lungesykdommer av andre art. Pålitelige DNA-baserte metoder (for eksempel påvisning av *M. tuberculosis* ved PCR) kombinert med god kontakt mellom mikrobiolog og kliniker er viktig for optimalisering av håndteringen av mistenkte mykobakterieinfeksjoner.

## 2.9.15 Litteratur

1. Manual of Clinical Microbiology ASM Press, 8<sup>th</sup> edition, vol. 1, ed. P. Murray et al. pp. 532-59, 2003.
2. Olivier, KN. Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med*. 1998; 4: 148-53.
3. van Crevel, R. et al. The impact of NTM on management of presumed pulmonary tuberculosis. *Infection* 2001; 29: 59-63.
4. Olivier KN, Yankaskas JR, Knowles MR. Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease in cystic fibrosis. *Semin Respir Infect* 1996; 11: 272-84.
5. Chemlal K, Portaels F. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 77-83.
6. Bellamy R. Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics. *Genes Immun* 2003; 4: 4-11.
7. Hovig B. *Mycobacterium*. I Medisinsk mikrobiologi, 2. utg. Ed. Degre et al., sd. 195-209, 2001.
8. Olivier KN, Weber DJ et al., Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis Study Group. Nontuberculous mycobacteria. II: nested-cohort study of impact on cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 167: 835-40.
9. Holberg-Petersen M, Steinbakk M, Figenschau KJ, Jantzen E, Eng J, Melby KK. Identification of clinical isolates of *Mycobacterium spp.* by sequence analysis of the 16S ribosomal RNA gene. Experience from a clinical laboratory. *APMIS* 1999; 107: 231-9.
10. Tønjum T, Welty DB, Jantzen E, Small PL. Differentiation of *Mycobacterium ulcerans*, *M. marinum*, and *M. haemophilum*: mapping of their relationships to *M. tuberculosis* by fatty acid profile analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S rRNA gene sequence analysis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 918-25.
11. Rhodes MW, Kator H, Kotob S et al. *Mycobacterium shottsii sp. nov.*, a slowly growing species isolated from Chesapeake Bay striped bass (*Morone saxatilis*). *Int J Syst Evol Microbiol* 2003, 53: 421-4.
12. Tortoli E, Bartoloni A, Bottger EC et al. Burden of unidentifiable mycobacteria in a reference laboratory. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4058-65.

## 2.10 Pneumocystis

Peter Gaustad, Mikrobiologisk institutt, Rikshospitalet

### 2.10.1 Historisk perspektiv

*Pneumocystis* ble først identifisert av Chagas i 1909 og Carini i 1910. De påviste organismen i lungene til trypanosoma infiserte dyr og trodde den var en form av trypanosoma. I 1912 ble *Pneumocystis* beskrevet som en slekt av Delanöe og arten ble gitt navn til ære for Carini: *Pneumocystis carinii*. I 1930- og 1940-årene observerte man epidemier med interstitiell plasma celle pneumoni hos premature og underernærte barn i Øst-Europa. *Pneumocystis* ble identifisert som årsaken til denne typen pneumoni av Vanek og Jirovek i 1952. Senere, i 1960-årene ble *Pneumocystis* funnet som årsak til pneumoni hos immunkompromiterte pasienter. Antallet tilfelle eksploderte i 1980-årene da *Pneumocystis* pneumoni (PCP) ble funnet som en viktig manifestasjon av HIV/AIDS og som en viktig komplikasjon av kreft kjemoterapi og organtransplantasjon. Det har i 1990-årene vært en nedgang i tilfelle i forbindelse med bruk av profylakse hos risikopasienter og et ytterligere fall etter innføring av HAART behandling av AIDS-pasienter. Men fortsatt er *Pneumocystis* pneumoni den vanligste livstruende, opportunistiske infeksjonen hos HIV-infiserte pasienter.

Mikrobens morfologi, manglende vekst på soppmedier, ingen effekt antimykotika, men effekt av midler til behandling av protozoainfeksjoner, gjorde at man i mange år antok at den var en protozoo. Mikroben lar seg påvise ved soppfarging og data fra de siste års forskning gir holdepunkter for at *Pneumocystis* bør reklassifiseres som sopp. Dette er basert på mitokondiegen sekvenser, rRNA sekvens resultater, DNA homologi med spesielle gjærsopp og funn av en felles epitop ( $\beta$  1,3 glucan) mellom spesifikke sopp og *Pneumocystis*. De nye soppmidlene, echinokandinene, som hemmer  $\beta$ -glucan syntesen er virksomme mot *Pneumocystis*. Fylogenetiske studier antyder at mikroben har slektskap med Ascomycetes. Dens nærmeste slektning er gjærsopp *Schizosaccharomyces pombe* som formerer seg ved binær deling. Ut fra morfologiske og genetiske kriterier er *Pneumocystis* plassert sammen med *S. pombe* i fylum *Ascomycota* i en ny klasse kalt *Archiascomycetes*. *Pneumocystis* er en uvanlig sopp som mangler ergosterol i cellemembranen og derfor er resistent for amfotericin B og andre soppmidler som hemmer ergosterolsyntesen.

### 2.10.2 *Pneumocystis*: ny nomenklatur

De morfologiske egenskapene hos pneumocystis organismer er like uavhengig hvilken vert de finnes hos. Inntil 1976 ble ”*P. carinii*” oppfattet som en enkel art. Det er i dag klart at mikroben kjent som ”*P. carinii*” er en familie av beslektede organismer med vertsspesifisitet til arter av pattedyr. DNA undersøkelser har vist at *Pneumocystis* organismer fra forskjellige pattedyr varierer og at de er vertsspesifikke med hensyn til infeksjon. The nomen legitimum er nå *Pneumocystis jiroveci* som erstatter *P. carinii* f. sp. *hominis* som årsak til infeksjon hos mennesker. *P. carinii* er den vanligste arten av *Pneumocystis* hos rotter. På det nåværende tidspunkt er dette de to eneste autentiske artene av *Pneumocystis*, men i årene som kommer vil flere arter få navn. Ut fra forskjeller i ”internal transcribed spacer” (ITS) som er lokalisert i 18S og 5S rDNA er det mulig å genotype *P. jiroveci* og til nå har 4 genotyper blitt beskrevet.

### 2.10.3 Morfologi og livssyklus

Den morfologiske beskrivelsen av *Pneumocystis* er basert på at mikroben har blitt oppfattet som en protozo. *Pneumocystis* opptrer i to former, trofozoitt- og cysteform som begge kan påvises i alveolene ved infiserte lunger. En skjematisk fremstilling av antatt livssyklus kan ses i Fig. 1. Mikroben formerer seg ekstracellulært i lungealveolene hos pattedyr. I lungene adhererer trofozoittene til type I pneumocytter via makromolekylære broer. Denne adheransen gir nedsatt oksygenopptak siden gassutvekslingen mellom alveolære kapillær og alveolelumen foregår via type I pneumocytene. Tre utviklingsformer kan observeres: trofozoitten (trofisk stadium), precysten (sporocyt eller liten cyste) og cysten (spore eller stor cyste). Trofozoitten er 1-4 µm store med en ameboid form og opptrer ofte i hauger. Kjernen blir rødfarget og cytoplasmaet blåfarget ved Giemsa-farging. Den trofiske formen oppfattes som det vegetative stadiet i *Pneumocystis* syklus og den formerer seg her ved binær deling og ikke ved knoppskyting som de fleste gjæringsopp. I en seksuell fase danner de haploide trofozoittene ved konjugasjon en diploid zygote en precyste (4-6 µm og med 1 til 4 kjerner). Precysten gjennomgår meiosis, fulgt av mitose som gir opphav til en cysteform (5-8 µm). Denne har en tykk cellevegg som farges godt med Gomori-Grocotte sølvfarging. Cysten inneholder 8 haploide intracystiske legemer eller sporer som frigjøres gjennom en sprekk i celleveggen og resulterer i en tom cysteform.

Ut fra dyrestudier synes det klart at *Pneumocystis* overføres ved luftsmitte. Videre er det funn som tyder på at reservoaret for *Pneumocystis* er hos pattedyr. Det er sterke holdepunkter for at den infektøse dosen er liten, 10 *Pneumocystis* organsismer synes tilstrekkelig for å gi en fulminant infeksjon hos immunsupprimerte rotter. Serologiske studier har vist at mennesket smittes tidlig i livet. De fleste er seropositive (80-85%) i alderen 2 til 4 år.

### 2.10.4 Klinikk

Sykdomsbildet er pneumoni (*Pneumocystis* pneumoni, PCP). PCP er en viktig årsak til sykdom og død hos personer med svekket immunitet. Sykdommen har forskjellig klinisk bilde hos pasienter med og uten AIDS. CD4 cellene har en avgjørende rolle for å bekjempe infeksjonssykdom med *Pneumocystis*.

Hos AIDS pasienter kan sykdommen begynne langsomt med en inkubasjonstid opptil 2 måneder. Pasienten har en ikke produktiv hoste, lavgradig feber, nattesvette og dyspnoe uten uttalte kliniske funn. Risikopasienter har CD4 tall under 200 per µl.

Ikke-AIDS pasienter har PCP ofte ett mer akutt forløp. Pasienten kan være afebril med normalt antall hvite blodlegemer. PCP ble først beskrevet hos barn og ble i flere år oppfattet som en pediatrik infeksjon. Epidemier av "interstitiell plasma celle pneumoni" hos underernærte institusjonsbarn var de tidligste beskrivelsene. Symptomene ved PCP hos barn er cyanose, spill av nesevingene, respiratoriske inndragninger og mild hoste uten feber. Barn kan utvikle PCP ved CD4 tall over 1000 per µl. Immunkompetente pasienter med underliggende lungesykdom kan være bærere av *P. jiroveci*. Det er rapportert funn av *Pneumocystis* i andre organer enn lungene, men dette er relativt sjelden.

## 2.10.5 Diagnostikk

### 2.10.5.1 Indikasjon for undersøkelse

Undersøkelsen er kun indisert hos pasienter som har immunsvikt. I første rekke gjelder dette HIV/AIDS pasienter som har CD4 tall under 200 per  $\mu\text{l}$ . Andre pasientgrupper som har risiko for å utvikle PCP er premature barn, underernærte barn, barn med immunsviktsykdom (SCID), pasienter på immunosuppressiv behandling (kreftbehandling, etter organ transplantasjon, corticosteroidbehandling).

### 2.10.5.2 Prøvemateriale

Det diagnostiske utbyttet er avhengig av type prøvemateriale og pasientens underliggende tilstand. Pasienter med AIDS har et mye høyere antall *Pneumocystis* organismer i luftveiene enn ved PCP av andre årsaker og indusert sputum kan derfor brukes.

#### BAL

Denne prøvetakingen kan benyttes hos alle pasienter mistenkt for å ha PCP. Væske samlet ved BAL er flytende og trenger vanligvis ikke mykolytisk behandling (se senere). 20 til 30 ml væske sentrifugeres ved 3000xg i 15 min. Cytospin sentrifuge kan evt. benyttes. Bunnfallet slemmes opp i ca 1 ml fysiologisk saltvann og fordeles på objektglass og lufttørres før fiksering i absolutt metanol eller aceton. Adheransen til glasset kan forbedres ved å tilsette bovint serum albumin til prøven. (1 dråpe 22% bovint serum albumin til 0,5 ml prøvemateriale).

#### Indusert sputum.

Denne typen materiale er mest egnet fra AIDS pasienter som har en større mengde organismer i alveolene enn ikke-AIDS pasienter. Dyp inhalasjon av nebulisert 3% NaCl løsning vil hos pasienten utløse osmotisk opphoping av væske i og irritasjon av luftveiene med påfølgende hoste og ekspektorasjon av bronkealveolært materiale. Det induserte sputumet samles og minst 2 ml behandles mykolytisk med lik mengde nylaget 0,0065 M dithiothreitol (Stat-Pak Sputolysin) eller 0,5% N-acetyl-L-cystein. Blandingen inkuberes ved 35°C med resting og periodevis vortexing til materialet er *delvis* flytende. Komplette flytende materiale løser opp haugene av organismer og vanskeliggjør mikroskopi. Ny sentrifugering 3000xg i 5 min før bunnfallet plasseres på objektglass, lufttørres og varmetafixeres på varmeblokk (56-60°C). Ca 30 min. er nødvendig for å oppnå at materialet fester seg, siden den naturlige adhesjonen har blitt ødelagt av mukolysen. Evt kan bovint serum albumin tilsettes (se over). Cytospin sentrifuge kan også benyttes etter mukolysen.

#### Åpen lungebiopsi og transtrakeal biopsi.

Disse materialene tas ikke rutinemessig, men kan brukes til å lage avtrykkspreparat (touch imprints) eller homogeniseres (obs aerosol smitte) før materialet plasseres på objektglass. Nærmere beskrivelse finnes i ASM manual.

#### Prøver fra øvre luftveier.

Denne type prøvemateriale er ikke egnet til mikroskopisk undersøkelse pga liten mengde organismer. Det er rapportert at det er mulig å påvise *Pneumocystis*-DNA i nasofarynks

aspirat, halsskylingsvæske og munnpensler ved PCR med *Pneumocystis*-spesifikke primere. Foreløpig er ikke relasjonen mellom *Pneumocystis* i øvre luftveier og PCP etablert, men PCR påvisning vil være et nyttig supplement og spesielt hos barn hvor invasive teknikker er vanskelig å gjennomføre og hos pasienter som står på trimetoprim-sulfa profylakse og hvor *Pneumocystis* mengden er liten. Samlet materiale kan behandles med mukolyse som ovenfor og brukes til DNA ekstraksjon for PCR og suppleres evt. med mikroskopi.

### 2.10.5.3 Fiksering

Fiksering av materialet er avhengig av fargemetode. Til immunfluorescens brukes aceton og til de andre kan metanolfiksering brukes.

### 2.10.5.4 Fargemetoder og mikroskopisk identifikasjon

Mange forskjellige fargemetoder har vært brukt for å påvise *Pneumocystis*. Hematoxylin-eosin som ofte brukes av patologer, farger ikke mikroben, men det skummende eksudatet fra alveolene med et bivokskake utseende. Fargemetoder som påviser mikroben i form av trofozoitter, cysteform eller begge deler bør benyttes (se ASM manual).

En vanlig fargemetode er **Grocotte-Gomori sølvfarging** som kan brukes på BAL, indusert sputum og biopsier. Polysakkarider i soppens cystevegg og membran oksideres til aldehyder som videre reduserer sølvioner til metallisk sølv. Bakdelene med metoden er at fargeløsningene er ustabile og fargingen tar lang tid (2 timer for hurtig metoden). Denne metoden farger også andre sopp og en viktig skillende egenskap er at *Pneumocystis* ikke har knopp-skyting som f. eks *Candida albicans* som også kan være tilstede. Sølvfargede cyster (trofozoittene lar seg ikke farge) er brunsvarte, koppformede, runde eller kommaformede. Intracystiske strukturer farges ikke og tomme cyster (ikke levende) har samme utseende som de med sporer. Andre fargemetoder som farger cysteveggen er periodic acid\_Schiff, toluidinblått og calcofluor white. Sistnevnte er en enkel og hurtig metode, men krever øvelse. Giemsa/hurtig Giemsa farger alle stadier av *Pneumocystis*. Metoden visualiserer ikke cysteveggen og følgelig ikke tomme cyster, men kjernene i de forskjellige stadiene av livssyklus røde og cytoplasma lyst blått. Siden det er 10 ganger flere trofozoitter enn cyster, har den metoden en god følsomhet. Hurtig Giemsa er godt egnet til BAL-, indusert sputum- og avtrykkspreparater pga hurtighet og lave kostnader, men krever erfaren mikroskopør. Den metoden som er å anbefale er **immunfluorescens (IF)** med bruk av monoklonale antistoffer. Den kan anvendes på alle typer av aktuelt prøvemateriale og avlesningen er lett å utføre selv om laboratoriet ikke har stort antall prøver, men forutsetter at laboratoriet har et fluorescens mikroskop. Direkte og indirekte IF anvender monoklonale, fluorescein merkede antistoffer mot overflate glykoproteiner. Det er en fordel å bruke antistoffer som er rettet mot alle former av mikroben.

### 2.10.5.5 PCR metoder

Amplifikasjon av *Pneumocystis* DNA har ingen plass i rutinemessig diagnostikk av PCP, men i spesielle situasjoner som hos barn og evt ved mistanke om resistens mot TrimetoprimSulfa. *Pneumocystis* PCR er mer sensitiv enn konvensjonelle metoder, men påvisning av *Pneumocystis* DNA er ikke alltid relatert til aktiv sykdom siden man kan ha positiv *Pneumocystis* PCR uten at det foreligger aktiv infeksjon. Sulfamethoxazol regnes som den viktigste terapeutiske komponenten i TrimetoprimSulfa i behandlingen av *Pneumocystis*.



Sulfamethoxazol virker ved hemning av DPHS (dihydropteroat syntetase) i folsyresyntesen. Mutasjoner i DPHS (i nukleotide posisjonene 165 og 171) er assosiert med resistens og kan påvises med PCR teknikk. Forslag til primere for påvisning av *Pneumocystis* og sulfaresistens finnes i ASM manualen

### 2.10.5.6 Serologiske undersøkelser

Påvisning av antistoffer mot *Pneumocystis* har ingen plass i diagnostikken, men kan være nyttig i epidemiologiske studier. De fleste mennesker blir seropositive i 2-4 års alder og kommer i kontakt med mikroben flere ganger i løpet av livet.

### 2.10.6 Sammendrag

- 1) I følge dagens taksonomi klassifiseres *Pneumocystis* som Fungi. Etter ny nomenklaturen skal navnet være *Pneumocystis jiroveci*. Det finnes flere arter og de er vertsspesifikke med hensyn til hvilke pattedyr de infiserer.
- 2) Diagnosen av PCP baseres på direkte påvisning av organismen ved mikroskopi. Anbefalt metode er immunfluorescens (direkte eller indirekte) som farger både cyste- og trofozoittformer. Alternativ metode er hurtig Gomori-Grocotte sølvfarging (farger kun cyster) eller calcofluor white. Som ved all morfologisk diagnostikk kreves det erfaring og det anbefales at diagnostikken sentraliseres ved regionslaboratoriene.
- 3) Serologisk undersøkelse har ingen plass i diagnostikken.
- 4) PCR metoder har blitt utviklet og disse er sensitive og spesifikke, men kan ikke skille mellom sykdom og kolonisering/latent infeksjon. PCR diagnostikk av *Pneumocystis* har sin plass hos barn hvor prøvetakning er vanskelig og hos pasienter hvor mengden organismer er lav, f.eks pga profylaktisk behandling.
- 5) PCR for påvisning av sulfaresistens kan bli aktuelt.
- 6) PCR diagnostikk og påvisning av resistens vil sjelden bli aktuelt og bør kunne sentraliseres (til et laboratorium?). Rikshospitalet har etablert PCR diagnostikk av PCP.

### 2.10.7 Litteratur

1. Manual of Clinical Microbiology ASM Press, 8<sup>th</sup> edition, vol. 1, ed. P. Murray et al. pp. 1712-25, 2003.
2. Kovacs JA et al: new insights into transmission, diagnosis and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. JAMA 2001; 286: 2450.
3. Stringer JR et al: A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. Emerg Infect Dis 2002; 8: 891.

## 2.11 Cystisk fibrose

### 2.11.1 Strategi for dyrkning og resistensbestemmelse

Nils Olav Hermansen, Mikrobiologisk avdeling, Ullevål Universitetssykehus.

### 2.11.2 Innledning

Cystisk fibrose (CF) er en autosomal recessivt arvelig sykdom. Den rammer alle kroppens eksokrine kjertler, viktigst er slimkjertler i luftveiene, pancreas og tarm, samt svettekjertler. Pasienter med denne sykdommen blir ofte kronisk kolonisert med bakterier i nedre luftveier, og utvikler kronisk infeksjon. De viktigste patogener som forårsaker CF lungesykdom inkluderer *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia* species, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* og pneumokokker. *Mycobacterium* species, *Stenotrophomonas maltophilia* og andre ulike nonfermentative gram negative staver kan også finnes i luftveiene hos CF pasienter. Den kliniske betydning av disse mikrober må kartlegges nærmere. Mykobakterie-, sopp- og virus-diagnostikk vil ikke bli omtalt i denne presentasjonen.

### 2.11.3 Indikasjon for prøvetaking

De tilfeller der mikrobiologisk diagnostikk kan tenkes å ha terapeutisk konsekvens eller kan tenkes å påvirke generell terapeutisk strategi. Fagrådet / Norsk forening for cystisk fibrose anbefaler hyppig bakteriologisk dyrkning av ekspektorat/larynxaspirat med 4-6 ukers intervall.

### 2.11.4 Prøvemateriale

Små barn med CF produserer ofte ikke nok ekspektorat. Nasopharynxaspirat er anbefalt. Hos eldre barn og voksne er ekspektorat mest aktuelle prøvemateriale. Annet luftveismateriale som sendes til dyrkning er bihulesekret, bronkoalveolær lavage, mellomøresekret og annet materiale som taes i forbindelse med diagnostiske eller terapeutiske inngrep.

### 2.11.5 Mikroskopi av ekspektorat

Det anbefales at ekspektorat mikroskoperes for å se om materialet er representativt. Se sammendrag fra konsensusmøte nr. 9, 1995.

### 2.11.6 Dyrkningsmedier – atmosfære – dyrkningstid

CF pasienter får langvarige, bredspektrede antibiotikakurer, ofte hver 3 måned. Bakterier som koloniserer luftveiene til disse pasientene får endret vekstmønster og morfologi. Forslag til anbefalte dyrkningsbetingelser er angitt i tabellen nedenfor.

Dyrkningsmedium	Temperatur	Atmosfære	Inkuberingstid
Brunskål	35° C	CO <sup>2</sup>	Min. 2 døgn
Blodskål	35° C	CO <sup>2</sup>	Min. 2 døgn
Laktoseskål	35° C	CO <sup>2</sup>	Min. 3 døgn
Salt-mannitol-skål	35° C	CO <sup>2</sup>	Min. 2 døgn
Selektiv Burkholderia skål	35° C	Luft	Min. 3 døgn

Det kan være aktuelt å legge på en bacitracin-tablett på brunskålen og en optochin-tablett på blodskålen.

## 2.11.7 Pseudomonas aeruginosa

Andelen av CF pasienter kolonisert med *P. aeruginosa* øker med økende alder. CF pasienter med *P. aeruginosa* får en redusert lungefunksjon. *P. aeruginosa* dyrket fra luftveismateriale hos CF pasienter kan ha mange ulike morfologiske typer. Ulike former for mukoide og ikke mukoide varianter kan finnes i prøvematerialet. Noen stammer vokser etter 24 timers inkubering, men andre stammer krever lenger inkuberingstid.

### 2.11.7.1 Identifikasjon:

Kolonimorfologi.

Tre-rørs forgjæring.

Oxydase test

Standard multitest identifikasjonssystem. For eksempel API 20 NE

Ved usikker identifikasjon kan vedlagt identifikasjonsskjema benyttes.

Ved første gangs isolering av *P. aeruginosa* er det spesielt viktig med sikker identifikasjon. Påvisning av *Ps. aeruginosa* for første gang hos en CF pasient har store behandlingmessige konsekvenser.

## 2.11.8 Burkholderia cepacia komplekset

Nye genteknologiske tester har vist at *Burkholderia cepacia* består av minst 9 genomvarianter. Disse betegnes i dag å tilhøre *B. cepacia* komplekset. Hos CF pasienter har funn av bakterier som tilhører *B. cepacia* komplekset viktige behandlings- og sykehushygieniske konsekvenser. Noen CF pasienter som får *B. cepacia* komplekset i sine luftveier får en alvorlig sykdomsutvikling og tidlig død. Andre får en mildere sykdomsutvikling. Flere studier har vist at *B. cepacia* komplekset kan spes mellom CF pasienter etter innleggelse på sykehus eller ved sosial kontakt utenfor sykehus. Ved CF sentre i verden har en hatt spredning av epidemiske stammer av *B. cepacia* komplekset.

Det kan være vanskelig å detektere *Burkholderia* species fra CF luftveismateriale, særlig hvis pasienten er kolonisert med mukoid *P. aeruginosa*.

### 2.11.8.1 Dyrkningsmedium

Anbefales selektivt *Burkholderia* medium.

Alternativer selektive medier: BCSA medium, MAST medium,

OFPBL medium

### 2.11.8.2 Identifikasjon

Kolonimorfologi.

Vekst på selektivt medium.

Tre rørs forgjæring.

Oxydase test

Standard multitest identifikasjonssystem. For eksempel API 20 NE

16 S DNA sekvensering.

*Burkholderia* stammer fra CF pasienter sendes referanselaboratorium/utlandet.

*Burkholderia cepacia* komplekset inneholder 9 ulike genomvarianter som omfatter:

<i>B. cepacia</i>	( genomovar I )
<i>B. multivorans</i>	( genomovar II )
<i>B. cenocepacia</i>	( genomovar III )
<i>B. stabilis</i>	( genomovar IV )
<i>B. vietnamiensis</i>	( genomovar V )
<i>B. dolosa</i>	( genomovar VI )
<i>B. ambifaria</i>	( genomovar VII )
<i>B. anthina</i>	( genomovar VIII )
<i>B. pyrrocinia</i>	( genomovar IX )

Genomovariant II og III er dominerende hos CF pasienter.

### 2.11.9 Staphylococcus aureus

#### 2.11.9.1 Identifikasjon

Kolonimorfologi

Stafylokokk agglutinasjon eller DNase

Se forøvrig Strategimøterapport nr. 14, 2000.

### 2.11.10 Haemophilus influenzae

#### 2.11.10.1 Identifikasjon

Kolonimorfologi.

X- og V- faktor undersøkelse

### 2.11.11 Pneumokokker

#### 2.11.11.1 Identifikasjon

Kolonimorfologi

Optochin test. Evt. supplert med agglutinasjonstest.

## **2.11.12 Resistensbestemmelse av CF bakteriestammer**

Hvilke antimikrobielle midler bør inngå i resistensbestemmelsen?

### **2.11.12.1 Store gram negative staver**

**Standard resistensbestemmelse** bør inkludere følgende antibiotika:

- Ampicillin
- Aztreonam
- Ceftazidim
- Cefuroxim
- Ciprofloxacin
- Imipenem
- Kloramfenikol
- Trimetoprim-sulfa
- Tobramycin
- Colistin
- Meropenem
- Piperacillin/tazobactam

Resistensbestemmelsen utføres med E-tester.

### **2.11.12.2 Staphylococcus aureus**

**Standard resistensbestemmelse** bør inkludere følgende antibiotika:

- Penicillin G (beta-laktamase test)
- Oxacillin ( med spesifikk metode)
- Erythromycin
- Klindamycin
- Fucidin
- Cefalotin
- Trimetoprim-sulfa
- Doxycyclin

#### **2.11.12.2.1 Utvidet resistensbestemmelse**

Ved samtidig funn av non-fermentative Gram-negative staver legges til:

- Ciprofloxacin
- Tobramycin

Ved funn av MRSA utføres E-test med vancomycin.

### 2.11.12.3 **Haemophilus influenzae og pneumokokker**

Standard resistensbestemmelse bør inkludere følgende antibiotika:

Ampicillin (beta-laktamase test HI)

Cefalotin

Doxycyclin

Erythromycin

Kloramfenikol

Penicillin G (beta-laktamase test HI)(OXA 1 ug tabl for pneumokokker)

Azithromycin

Ciprofloxacin

Trimetoprim-sulfa

#### **2.11.12.3.1 Utvidet resistensbestemmelse.**

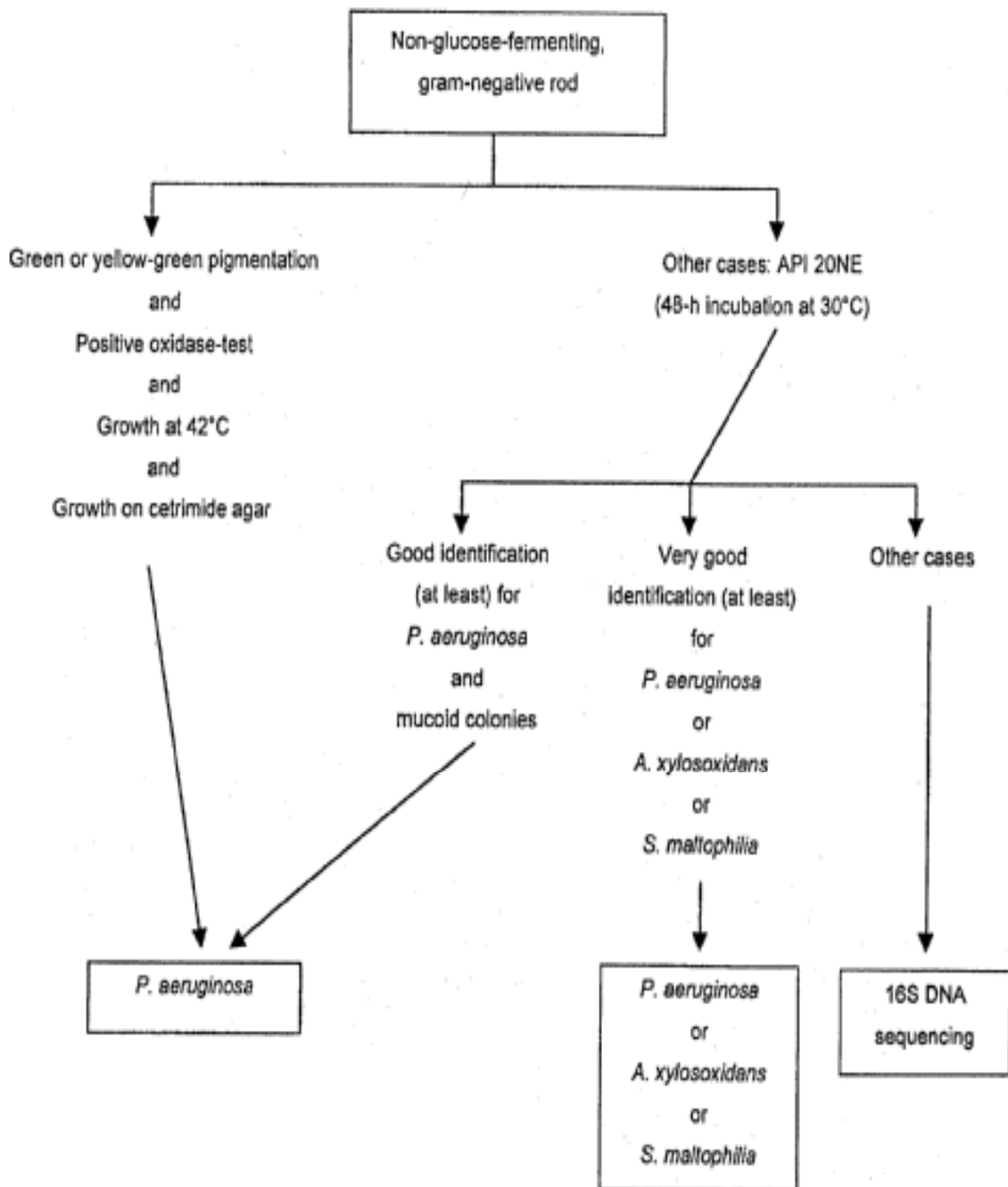
Ved funn av penicillinasedannende *Haemophilus influenzae*:

Cefuroxim

Ceftazidim

Ceftriaxon

Figur 1 Flow-chart for identification of non-glucose-fermenting gram-negative rods



#### 2.11.12.4 Litteratur

1. Manual of Clinical Microbiology. Sixth edition. Section V p.509-33.
2. Høiby N, Koch C, Fredriksen B. Cystisk fibrose. Nordisk medisin 1998; 113: 328-30.
3. Govan JRW, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev 1996; 539-74.
4. Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 1991; 35-51.
5. Hodson ME, Geddes DM. Cystic fibrosis. Chapman and Hall medical. 1995, p.75-98.
6. Pier BP. *Pseudomonas aeruginosa*: a key problem in cystic fibrosis. ASM news 1998; 64: 339-47.
7. Ledson MJ et al. Cross infection between cystic fibrosis patients colonised with *Burkholderia cepacia*. Thorax 1998; 53: 432-6.
8. Henry D et al. Comparison of isolation media for recovery of *Burkholderia cepacia* complex from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1999; 1004-7.
9. Wright RM et al. Improved cultural detection of *Burkholderia cepacia* from sputum in patients with cystic fibrosis. J. Clin Pathol 2001; 54: 803-5.
10. Tablan OC et al. Laboratory proficiency test results on use of selective media for isolating *Pseudomonas cepacia* from simulated sputum specimens of patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1987; 485-7.
11. Miller MB, Gilligan PH. Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis J Clin Microbiol 2003; 4009-15.
12. Ferroni Agnes et al. Use of 16S rDNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center. J Clin Microbiol 2002; 3793-7.
13. Henry DA et al. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. J Clin Microbiol 2001; 1073-8.
14. Coenye T, Vandamme P, Govan JRW, Lipuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. J Clin Microbiol 2001; 3427-36.
15. Shelly DB et al. Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. J Clin Microbiol 2000; 3112-5.
16. McMenamin JD et al. Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US cystic fibrosis treatment centers. Chest 2000; 117: 1661-5.
17. Pelt CV et al. Identification of *Burkholderia* spp. In the clinical microbiology laboratory: Comparison of conventional and molecular methods. J Clin Microbiol 1999; 2158-64.
18. Vermis K et al. Evaluation of species-specific *recA*-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex. J Med Microbiol 2002; 51: 937-40.
19. Mahenthalingam E et al. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. J Clin Microbiol 2000; 3165-73.
20. Norsk forening for cystisk fibrose. Utredning, behandling og oppfølging av pasienter med cystisk fibrose. Fagrådet, oktober 2001.
21. Konsensumøte nr 9, 1995. Bakteriologisk diagnostikk av luftveisinfeksjoner.
22. Strategimøte nr. 14, 2000. Stafylokokker.



## Tidligere rapporter fra:

- Strategimøte nr 1 (1987): *Fæcesdiagnostikk*
- Strategimøte nr 2 (1988): *Næringsmiddelinfeksjoner/intoksikasjoner og Parasittologi*
- Strategimøte nr 3 (1989): *Anaerob diagnostikk*
- Strategimøte nr 4 (1990): *Mykologi*
- Strategimøte nr 5 (1991): *Bakteriologiske og mykologiske undersøkelser i forbindelse med underlivsprøver*
- Strategimøte nr 6 (1992): *Resistensbestemmelse*
- Strategimøte nr 7 (1993): *Bakteriologisk diagnostikk ved urinveisinfeksjon*
- Strategimøte nr 8 (1994): *Mykobakterier*
- Strategimøte nr 9 (1995): *Bakteriologisk diagnostikk ved luftveisinfeksjoner*
- Strategimøte nr 10 (1996): *Bakteriologiske fæcesundersøkelser*
- Strategimøte nr 11 (1997): *Bakterielle infeksjoner i hud og bløddeler*
- Strategimøte nr 12 (1998): *Kravfulle/uvanlige bakterier*
- Strategimøte nr 13 (1999): *Sikkerhetsregler og smitteforebygging i medisinsk mikrobiologiske laboratorier*
- Strategimøte nr 14 (2000): *Stafylokokker*
- Strategimøte nr 15 (2001): *Streptokokker*
- Strategimøte nr 16 (2002): *Blodkultur*

**Ringtester:**

Styremøtet for medisinsk-mikrobiologiske laboratorier i Norge etablerte i 1982 et program for eksterne kvalitetsvurderinger i bakteriologi, mykologi og parasittologi ("ringtester") i Norge.

Ansvar for programmet ble lagt til en Referansegruppe som idag består av 5 representanter for de deltagende laboratorier. Disse velges for 4 år om gangen.

Organiseringen og den praktiske gjennomføringen av programmet ble lagt til en arbeidsgruppe med permanent sete ved Avdeling for bakteriologi, Statens Institutt for Folkehelse. Programmet består av 4 utsendelser pr år som hver vanligvis består av 4 simulerte kliniske materialer med tilhørende kliniske opplysninger. Prøvene sendes ut "åpent", dvs. at deltagerne vet at det dreier seg om en ringtest, men de skal likevel behandle materialene i størst mulig grad som ordinære kliniske prøver. I henhold til egen rutine skal de således gjennomføre isolering, identifikasjon og eventuelt resistensbestemmelse av mulige patogener samt vurdere den kliniske betydning av funnet.

Flertallet av materialene representerer vanlige diagnostiske problemer. Enkelte av problemene kan likevel være sjeldne eller vanskelige, idet de er valgt ut med tanke på å minne deltagerne om uvanlige, men likevel viktige kliniske situasjoner eller for å informere dem om f.eks. en aktuell epidemiologisk situasjon, ny viten o.l.

Hver utsendelse avsluttes med en oppsummerende rapport fra arbeidsgruppen.

**Strategimøter:**

Hvert år arrangeres det innen rammen av ringtestprogrammet et strategimøte (tidligere kalt konsensusmøte) hvor et spesifikt tema blir tatt opp til diskusjon.

Ansvarlig arrangør er Referansegruppen. Denne utpeker vanligvis for hvert enkelt møte en programkomité blant deltagerne som blir ansvarlig for program og gjennomføring av møtet. Deltagere på møtet er én representant for hvert laboratorium som er med i ringtestprogrammet samt enkelte fremtredende klinikere innen det aktuelle området som skal diskuteres. Alle mikrobiologisk relevante aspekter innen det aktuelle temaet diskuteres med tanke på å komme fram til felles aksepterte retningslinjer og prosedyrer.

Hvert strategimøte avsluttes med en rapport hvor premissene og konklusjonene fra diskusjonene nedfelles. Ansvarlig for rapporten er den aktuelle programkomitèen.