

Rapport for 2015 fra Det nasjonale referanselaboratorium for medisinske soppsykdommer, Mikrobiologisk avdeling, OUS - Rikshospitalet, Helse Sør-Øst HF.

Det nasjonale referanselaboratorium for medisinske soppsykdommer ble formelt opprettet ved Mikrobiologisk institutt, RR-HF etter vedtak i Helse- og omsorgsdepartementet 3/12 2005. Referanselaboratoriet utfører undersøkelser på prøver og isolater som er tilsendt og på prøver fra OUS Rikshospitalet.

Leger og bioingeniører tilknyttet referansefunksjonen utfører oppgavene ved siden av sine oppgaver ved Mikrobiologisk avdeling. Lonny Marie Kløvfjell er fagansvarlig bioingeniør og Cecilie Torp Andersen er fagansvarlig overlege for referanselaboratoriet og har i 2015 overtatt som norsk representant i EUCAST subcommittee on AFST (antifungal susceptibility testing) etter Peter Gaustad.

Referanselaboratoriet har nært forskningssamarbeid med Regionalt forskningsnettverk for sopp- infeksjoner i HelseSør-Øst ledet av professor Peter Gaustad. (Invasive fungal infections: epidemiology, resistance mechanisms and host-pathogen interactions).

Nedenfor følger en redegjørelse for aktiviteten i 2015 i henhold til de punkter som er satt opp i rundskrivet som fulgte tildelingsbrevet.

1. Påvisning.

Alle gjærsoppisolater fra blodkultur fra alle norske mikrobiologiske laboratorier skal etter avtale sendes til Det nasjonale referanselaboratorium for medisinske soppsykdommer. I 2015 mottok Referanselaboratoriet 203 soppisolater fra blod, hvorav 199 Candida isolat. Isolatene identifiseres og resistensbestemmes. *C.albicans* er hyppigste agens og utgjorde i 2015 knapt 67 % av de invasive isolatene, med stabil andel *C.glabrata* på 16 % som nummer to. Andelen av andre Candida arter er liten, *C.tropicalis*, *C.dubliniensis*, og *C.parapsillosis* utgjør hver 3-4 %. I 2015 mottok vi bare 4 non- Candida soppisolat (2 %) fra blod mot 10 året før.

De medisinske mikrobiologiske laboratorier sender stadig flere gjær- og muggsoppisolater fra andre lokalisasjoner enn blod til nærmere identifikasjon eller resistensbestemmelse. I 2015 mottok vi 191 slike gjærsoppisolat og 79 muggsoppisolater. Vi registrerer at en økende andel av Candida isolatene er fra luftveier, hud og slimhinner og må innstendig be om at henvisende laboratorier *ikke rutinemessig* sender slike isolat til oss da dette er tidkrevende og oftest en unødvendig undersøkelse av normalflora.

Vi ønsker fortsatt å få tilsendt alle invasive isolat og muggsoppisolat fra potensielt systemiske infeksjoner eller hvor kliniker planlegger behandling med antifungale midler.

Vi registrerer et vedvarende lavt antall tilsendte dermatofyttisolat til identifikasjon; 32 isolater mot 27 isolat i 2014, en tendens vi tror har sammenheng med økende utbredelse av dermatofytt PCR ved andre laboratorier. Samtidig etterlyser vi en økt innsats med identifikasjon av vanlige dermatofytter ved primærlaboratoriene da 27 av de tilsendte isolatene var ulike Trichophyton-arter dominert *Trichophyton rubrum*.

Vi har følgende påvisnings- og identifiseringsmetoder:

- a) **Mikroskopi:** Vi har en stab på 3 bioingeniører og 1 lege som har bred erfaring med mikroskopi. I tillegg mikroskoperer våre LIS leger prøver fra rutinen.
- **Calcofluorwhite farging:** Ved direkte mikroskopi av prøvematerialet brukes denne fargemetoden for påvisning av soppelementer i vev. Dette er en rask og relativ sensitiv metode. Alle biopsier, aspirat, puss og bronkialskyllvæsker fra immunsupprimerte med klinisk mistanke om soppinfeksjon bør mikroskoperes med denne eller en annen egnet fargemetode. Antallet undersøkelser med Calcofluorwhite mikroskopi økte fra 132 til 218 undersøkelser i 2014, med en nedgang siste år til 166.
 - **Pneumocystis immunfluorescens mikroskopi** utføres rutinemessig på alle PCP PCR positive prøver som semikvantitativt kommer i kategorien "moderat-" eller "sterkt positiv". Antallet er økende fra 126 i 2014 til 179 i 2015.
 - **Giensa farging** kan benyttes til påvisning av dimorf sopp i benmarg, men benyttes lite hos oss.
- b) **Dyrkning med identifisering:** Primær dyrkning av muggsopp-prøver utføres på SAB skåler som inkuberes ved 28 og 37 grader i 5-30 dager avhengig av problemstilling. For gjærsoppdyrkning fra slimhinner og overfladiske prøver benyttes kun inkubering i 37 grader i 2 døgn.
- Til identifikasjon av soppisolat benyttes følgende metoder:
- **Massespekterundersøkelse (Maldi-TOF):** Dette er nå hovedmetoden for identifikasjon av gjærsopp som sammen med morfologi og farge på **kromogen agar** danner grunnlaget for artsidentifikasjonen. Vekstmorfologi på **PAL** agar benyttes unntaksvis.
 - **Vekstbetingelser, morfologi og mikroskopi:** For identifikasjon av dermatofytter og muggsopp er vekstbetingelser, morfologi og mikroskopi fortsatt viktige men tidkrevende hjelpemiddel.
 - **Tapepreparat:** Ved identifikasjon av dermatofytter og annen filamentøs sopp er mikroskopi fra kulturer med bomullsblått. (**bromthymol-cotton-blue**) fortsatt viktig for riktig artsidentifikasjon.
 - **Biokjemiske metoder** brukes kun unntaksvis.
 - **Sekvensering av soppisolat.** ITS2 sekvensering på kulturer benyttes ved vanskelig eller ikke entydig identifisering av ulike sopparter, i tillegg kan andre målområder av soppgenomet som D1D2 benyttes for bedret artsidentifikasjon.
 - **Massespekterundersøkelse (Maldi-TOF) av filamentøs sopp og dermatofytter** er et nyttig supplement til annen identifisering av filamentøse sopp, enten ved direkte metode eller etter inkubering i flytende medium.
- c) **Påvisning av sopp DNA:**
- Spesifikke PCR analyser til bruk direkte på prøvematerialet:**
- **Påvisning av *Aspergillus sp* DNA og *Aspergillus fumigatus* DNA ved PCR:** Metododen ble tatt i bruk i 2013 og har nå økt fra hhv 87 og 86 utførte analyser til hhv 664 og 661 utførte analyser. Begge PCR undersøkelsene gjøres vanligvis parallelt og utføres fortrinnsvis på sterilt materiale, men kan især hos immunsupprimerte og transplanterte pasienter også gjøres i luftveismateriale som BAL som et supplement til galaktomannan. Vi kan utføre analysene kvantitativt i serum, men denne metoden er foreløpig lite brukt da påvisning av *Aspergillus* (galaktomannan)-antigen synes å være en mer sensitiv og mer reproducerbar undersøkelse i blod.

- **Påvisning av Dermatofytt DNA:** Metoden har i økende grad erstattet dyrkning ved diagnostikk av dermatofyttinfeksjoner. Vi finner fortsatt nedgang fra 1748 analyser i 2012 til 990 i 2015. Dette er i hovedsak polikliniske prøver fra vår region og reduksjonen antas å ha sammenheng med at flere laboratorier i regionen nå tilbyr samme metodikk.
- **Påvisning av Mucoralis DNA:** Dette er en nyutviklet PCR undersøkelse som påviser DNA fra hhv *Rhizomucor sp*, *Lichtheimia sp* og hhv *Mucor sp* eller *Rhizopus sp* direkte i prøvematerialet. Metoden er ny av året og synes svært lovende som supplement til diagnostikken av disse fryktede infeksjonene som krever spesiell behandling. Positiv PCR har korrelert godt med funn enten ved mikroskopi og eller ved dyrkning. Undersøkelsen kan gjøres parallelt med *Aspergillus sp* kvalitativ PCR og *Aspergillus fumigatus* kvalitativ PCR i serum, BAL, spinalvæsker, biopsier og annet fortrinnsvis sterilt vev.
- **Påvisning av Pneumocystic jirovecii DNA:** Vi utførte 898 analyser i 2015 mot 796 analyser i 2014. Undersøkelsen tilbys alle hverdager og besvares som en semikvantitativ undersøkelse med påfølgende IF mikroskopi forbeholdt moderat positive og sterkt positive prøver.
- **Påvisning av soppDNA direkte på prøvematerialet:** Der sopp ikke påvises ved hjelp av spesifikke PCR undersøkelser kan soppDNA påvises direkte på prøvematerialet ved hjelp av påvisning av ulike målgener som er felles for de fleste sopparter. Tidligere benyttet vi målgenene 18S rDNA og ITS1 rDNA til PCR og eventuell sekvensering som velbevarte felles gener for sopp, i 2014 innførte vi til ITS2 og D1D2. Der soppDNA påvises utføres en sekvensering og gensekvensene kan sammenlignes med tilsvarende sekvenser i internasjonale databaser for sopp. Dette er en arbeidskrevende metode og da DNA fra alle eventuelle sopparter i prøven oppformes bør undersøkelsen IKKE utføres på materialer der sopp inngår som en del av normalfloraen. I 2015 kunne antallet undersøkelser reduseres fra 772 i 2014 til 440 takket være innføring av nye spesifikke og mer sensitive PCR-undersøkelser.

d) Serologi:

Presipiterende antistoffer mot Aspergillus

- Vi påviser presipiterende antistoffer mot *Aspergillus fumigatus* og da antistoffmengden kan korrelere med sykdomsmaniferasjon blir positiv prøve også undersøkt med titrering av antistoff mot (*Aspergillus*) katalase.
- Ved mistanke allergisk alveolitt kan vi også påvise antistoff mot fugleantigener (due, høns, undulat) i tillegg til *Aspergillus* antistoffer med samme metode.

Presipiterende antistoffer mot dimorfe sopparter.

- Vi påviser antistoff mot *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* og *Coccidioides immitis*. Slike infeksjoner er importsykdommer vi sjeldent ser i Norge, men de kan sees som akutte infeksjoner etter reiser i endemiske områder eller i forbindelse med reaktivering ved immunsvikt. Metoden påviser presipiterende antistoff mot disse agens.

e) Antigenpåvisning

Galaktomannan (Aspergillus antigen) påvisning.

- Metoden er godt innarbeidet som screeningstest mtp invasiv aspergillose i serum for utvalgte høyrisikopasienter og benyttes som surrogatmarkør for invasiv aspergillusinfeksjon i serum, BAL og spinalvæske. Antallet prøver øker fortsatt, 2179 i 2015 mot 1911prøver i 2014.

- Analysen er et nyttig supplement til annen utredning ved mistanke om *invasiv* aspergillose hos immunsupprimerte pasienter hvor samtidig undersøkelse av BAL er spesielt viktig hos pasienter *uten* nøytropeni da galaktomannan i serum ofte er negativ og *ikke* utelukker invasiv aspergillose hos disse pasientene.
- Analysen er forbeholdt pasienter som er immunsupprimert, og utføres kun unntaksvis uten kliniske opplysninger.

Kryptokokkantigen:

- Vi påviser Kryptokokkerantigen med 2 ulike metoder, enten en hurtigtest ved hjelp av immundiffusjon (IMMY) i serum, spinalvæske og eventuelt BAL eller ved hjelp av en agglutinasjonstest for påvisning av antigen i spinalvæske eller serum (Orion Diagnostica, Espoo, Finland). Analysen utføres på referanselaboratoriet som en ø.hjelpsanalyse.
- Alle positive prøver titreres og vi kan motta positive prøver fra andre laboratorier for verifisering og titrering. Analysen er akkreditert.

Tabell 1: Analyser utført på tilsendte isolater og prøver i 2015 sammenlignet med 2014, 2013 og 2012 ved Det nasjonale referanselaboratorium for medisinske sopp sykdommer:

Analyse	2012	2013	2014	2015
Gjærsoppisolat fra blod til identifisering og resistensbestemmelse	186	195	209	203
Gjærsopp: Tilsendte isolat fra andre lokalisasjoner	112	133	183	191
Muggsopp: Tilsendte isolat	78	63	73	79
<i>Pneumocystis jiroveci</i> PCR	618	833	796	898
Pneumocystis IF	102	129	126	179
Calcofluorwhite mikroskopi	69	132	218	166
Dermatofytter: Tilsendte isolater	55	60	27	32
Dermatofytt PCR	1748	1438	1270	990
Direkte sopp påvisning i materiale (ITS2+D1D2 rDNA)	402	526	572	440
<i>Aspergillus sp</i> PCR	10	87	337	664
<i>A.fumigatus</i> PCR	10	86	333	661
Mucoralis PCR				11
Antistoffer dimorfe sopp	25	31	21	39
Fugleantigen	14	7	8	9
<i>A. fumigatus</i> (presipiterende) antistoff	114	98	112	141
<i>A. fumigatus</i> katalase antistoff	13	11	7	16
Galaktomannan	99	2016	1911	2179
Kryptokokkantigen	92	134	111	130*

2. Detaljkarakterisering av stammer:

Candida albicans er hyppigst isolert ved candidemi. Andelen i 2015 var 67,8 %. *C.glabrata* utgjør 16,6 % mens andel av andre candidaarter er lav, *C.tropicalis* *C.dubliniensis* og *C.parapsilosis* er av disse hyppigst forekommende med 3- 4 %.

Arbeid med videre karakterisering av *C. albicans* pågår for å se på kloner som forekommer ved residiverende candidemier og ved lokale utbrudd.

Ved usikker identifikasjon eller for endelig identifikasjon av invasive muggsoppisolat utføres ITS2 sekvensering eller D1D2 sekvensering av isolatet for identifikasjon til artsnivå. Molekylærbiologien har endret tradisjonell mykologi og systematikk, og selv en slik sekvensering er ikke nok til en entydig karakterisering av nære arter innen for eksempel *A.fumigatus*-komplekset eller *A.niger*-komplekset, og vi samarbeider med vår utviklingsseksjon om innføring av nye målsekvenser som betatubulin for bedret identifikasjon og karakterisering av stammer.

3. Resistensundersøkelse:

I Norge påviser vi lite ervervet resistens i invasive Candidaisolat, mens det internasjonalt registreres en økning av ervervet resistens især i *C.glabrata*. Internasjonalt settes også økt forbruk av echinocandiner i sammenheng med økende andel naturlig resistente sopparter og økende forekomst av non-Candidastammer, oftest echinocandinresistente arter, fra blodkultur.

Resistensundersøkelse utføres i samsvar med krav fra og i samarbeid med NORM. Alle systemiske soppisolater blir resistensbestemt. For isolat fra candidemier blir resultatene av resistensbestemmelsen rapportert i NORM/NORM-VET årlig. Metodene som benyttes er MIC-gradienttest (E-test) og i noen grad buljongfortynning (mikrotiterplateteknikk) som er EUCASTs referansemetode. Inntil denne metoden er implementert i rutinen ved referanselaboratoriet og i påvente av egen metodikk for verifisering av genetisk echinocandinresistens hos Candidaarter samarbeider vi med Statens Serum institutt i København for verifisering av antatt ervervet resistens hos Candida.

Referanselaboratoriet har deltatt i arbeidet for standardisering av brytningspunkter for soppmidler gjennom EUCAST, og vi har nasjonal representant i EUCAST-AST.

Påvisning av azolresistens hos *Aspergillus fumigatus*. Det er i 2015 innført en metode for genetisk påvisning av azolresistens ved hjelp av sekvensering av cyp51 genot hos *Aspergillus* sp. TR₃₄/L98H og TR₄₆/Y121F/T289A er de vanligste genvariantene som påvises ved azolresistens, og i forbindelse med innføring av metoden har vi funnet begge variantene i kliniske *Aspergillus* isolat. Vi planlegger å innføre en fenotypisk *screeningtest* på azolresistens på våre *Aspergillus* isolat, og vil vurdere å anbefale en nasjonal overvåkning.

4. Stammebank for sopp

Det er etablert en diagnostisk stammebank ved candidemier. I tillegg samles alle andre tilsendte soppisolater i stammebanken sammen med våre egne isolat med antatt klinisk betydning.

5. Kvalitetskontroll

I 2007 ble soppundersøkelsene ved laboratoriet akkreditert. Laboratoriet deltar i ekstern kvalitetskontroll gjennom UK NEQAS, QCMD og INSTAND. Vi har deltatt i et nordisk samarbeid om galaktomannan kvalitetskontroll, men håper nå at en etablert SLP leverandør tar over stafettspinnen. Vi deltar dessuten i et nordisk samarbeid med kvalitetskontroll av *Pneumocystis immunfluorescens* mikroskopi.

6. Reagens og stammeforsyning til brukere/laboratorier:

Vi har samarbeidet med andre laboratorier vedr kontrollstammer for dermatofytt PCR.

7. Metodeutvikling og forskning:

Referanselaboratoriet jobber for å implementere EUCAST buljongfortynning som referansemetode ved resistensbestemmelse av gjærsopp.

Vi samarbeider dessuten med andre seksjoner, både seksjon for virologi og infeksjonsimmunologi (VIM) og utviklingsseksjonen for kontinuerlig forbedring av vår soppdiagnostikken.

Innføring av metode for påvisning av 1,3 beta-3 gluknan:

Validering av metoden har av budsjettmessige årsaker vært satt på vent, men er nå besluttet gjennomført i 2016. 1,3 beta-3 gluknan en "pan-sopp" markør i serum til screening av risikopasienter. Påvisning av 1,3 beta-3 gluknan vil dessuten sammen med semi-quantitativ PCR og IF mikroskopi ved pneumocystis infeksjoner kunne bidra til forbedret diagnostikk og forhåpentligvis tjene som støtte for å kunne skille bedre mellom mulig PCP kolonisering og infeksjon.

Nye målgener ved sekvensering av muggsopp: Fortsatt jobbes det med forbedring av metoden for påvisning av ulike soppgener direkte i prøvematerialet og identifikasjon av isolat ved å innføre nye målsekvenser som betatubulin for bedret identifikasjon til artsnivå innen de ulike *Aspergillus* kompleksene.

Candida PCR: Det er satt i gang utviklingsarbeid for å kunne implementere en metode for påvisning av *Candida* DNA direkte på prøvematerialet.

Pågående forskningsprosjekter og forsknings samarbeid:

I samarbeid med Regionalt forskningsnettverk for invasive soppinfeksjoner har doktorgradsstipendiat Liv Hesstvedt et prosjekt vedrørende karakterisering og resistensbestemmelse av alle invasive candidaisolat i Norge, første artikkel er publisert og hun bearbeider nå epidemiologiske data fra samtlige pasienter med candidemi. Det er etablert et samarbeid med de ulike mikrobiologiske laboratoriene, infeksjonsmedisinere og pediatere i Norwegian Fungal Network ledet av Ingvild Nordøy.

I samarbeid med Regionalt forskningsnettverk for invasive soppinfeksjoner og UMB, Ås arbeides det med å karakterisere den antifungale effekten av chitosan på gjærsopp og muggsopp. Synergistisk effekt i kombinasjon med kjente antifungale midler undersøkes også.

8. Rapportering.

Alle resultater av identifisering og resistensbestemmelse rapporteres tilbake til rekvirent. Alle meldepliktige funn meldes til MSIS. Rapportering til NORM-NORM-VET.

9. Informasjon og tilbakemelding

Det er etablert god kontakt mellom de medisinske mikrobiologiske laboratoriene i landet. Vi er alle en del av Norwegian Yeast Study Group, og samarbeider om innsending av isolat til NORM.

Strategirapporten ble endelig ferdigstilt i 2015 med oppdatert informasjon om soppdiagnostikk

Det er opprettet en egen hjemmeside for referanselaboratoriet på OUS hjemmeside over referansefunksjoner med link fra domenet www.mykologi.no Siden vil videreutvikles for å nå rekvirentene med nyttig informasjon om virksomheten ved laboratoriet.

Oslo 29.02.16



Cecilie Torp Andersen
Overlege
Avdeling for mikrobiologi
OUS, Rikshospitalet



Fredrik Müller
Avdelingsleder
Avdeling for mikrobiologi
OUS

Publikasjoner 2015:

Hesstvedt L, Gaustad P, Andersen CT, Haarr E, Hannula R, Haukland H, Hermansen NO, Larssen KW, Mylvaganam H, Ranheim TE, Sandven P, and Nordøy, I. (2015). Twenty-two years of candidaemia surveillance: Results from a Norwegian national study. [Clinical Microbiology and Infection](#). 21(10), s 938-945.

van der Linden JWM, Arendrup MC, Warris A, Lagrou K, Pelloux H, Hauser PM, et al. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis*. 2015 Jun [date cited].
<http://dx.doi.org/10.3201/eid2106.140717><http://www.cdc.gov/Other/disclaimer.html>

NORM NORM_VET 2014, *Candida* spp in blood cultures ISSN 1502-2307 (print)/ 1890-9965 (elektronisk)

Strategirapporten fra Strategimøtet nr 27, 2013 Soppinfeksjoner; utgitt desember 2015. ISSN 0804-8444/ISBN 978-82-8082-702-9 elektronisk utgave