

Årsrapport for 2017: Det nasjonale referanselaboratorium for medisinske sopp sykdommer

Referanselaboratoriet ble formelt opprettet ved Mikrobiologisk institutt, RR-HF etter vedtak i Helse- og omsorgsdepartementet 3/12-05.

Agens

Medisinsk mykologi omfatter flere hundre ulike agens. Ulike Candidaarter og dermatofytter er vanlige årsaker til overfladiske infeksjoner. Candida, *Pneumocystis jirovecii*, Aspergillus- og Mucoralesarter er vanligste agens ved invasive infeksjoner. I Norge er endemiske soppinfeksjoner med *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides* og *Blastomyces* svært sjelden.

Innledning der smittestoffet kort omtales

Vi håndterer mange ulike smittestoffer innen kategorien medisinske sopp sykdommer. Vi søker å tilby oppdaterte diagnostiske metoder for påvisning av sykdom, fortrinnsvis infeksjoner, forårsaket av sopp med hovedfokus på alvorlige invasive infeksjoner.

Anvendt referansediagnostikk og analysemetoder

Referanselaboratoriet utfører identifikasjon og resistensbestemmelse mot antimykotika for ulike sopparter tilsendt fra andre laboratorier. Vi tilbyr dessuten primærdiagnostikk ved ulike soppinfeksjoner og utfører ulike analyser på tilsendte pasientprøver og på prøver fra OUS Rikshospitalet.

I 2008 ble de fleste soppundersøkelsene ved laboratoriet akkreditert. Laboratoriet deltar i ekstern kvalitetskontroll gjennom UK NEQAS, QCMD og INSTAND. Vi deltar dessuten i et nordisk-nederlandsk samarbeid for kvalitetskontroll av *Pneumocystis* immunfluorescens mikroskopi.

Dyrkning med identifisering og resistensundersøkelse:

Primær dyrkning av muggsopp-prøver utføres på **Sabouraud (SAB)** skåler som inkuberes ved 28 og 37 °C i 5-30 dager avhengig av problemstilling.

Ved primær dyrkning av gjærsopp inkuberes SAB skåler og eventuelt **kromogent medium** i 2-3 døgn. Ved enkelte problemstillinger eller ved påvisning av sopp i vev forlenges inkubasjonstiden. Til gjærsoppdyrkning fra slimhinner og overfladiske prøver benyttes inkubering i 37 °C i 2 døgn.

Ved dermatofyttedyrkning benyttes SAB skåler og **mycobiotic agar m 0,04 % cycloheximid** som inkuberes aerobt i 28-30°C i fire uker.

Til identifikasjon av soppisolat benyttes følgende metoder:

1. **Massespektrometri (Maldi-TOF)** (Bruker); dette er hovedmetoden for identifikasjon av gjærsopp. Metoden er også et nyttig supplement til annen identifisering av filamentøse sopparter, enten ved direkte metode eller etter inkubering i flytende medium. Metoden ble validert for muggsopp i 2017, men er ikke tatt i bruk i rutinen.
2. **Vekstbetingelser, morfologi og mikroskopi:** For identifikasjon av dermatofytter og muggsopp er dette fortsatt viktige, men tidkrevende hjelpemiddel for artsidentifikasjon.
 - a. **Kromogen agar** (BD). Morfologi og farge på kromogen agar benyttes som supplement til annen identifikasjon av gjærsopp. Vekstmorfologi på **PAL** agar benyttes unntaksvis.
 - b. **Tapepreparat fra kulturer:** Ved identifikasjon filamentøs sopp er mikroskopi med **bromthymol-cotton-blue** (Lactophenol solution, Merck) viktig for riktig artsidentifikasjon, eventuelt benyttes tilsvarende farging av nålepreparat.
3. **Sekvensering av soppisolat.** ITS2 sekvensering på kulturer benyttes ved vanskelig eller ikke entydig identifisering av ulike sopparter, i tillegg benyttes andre målområder av soppgenomet som D1D2 for bedret artsidentifikasjon. Validering av andre målgener (beta-tubulin) er igangsatt.
4. **Biokjemiske metoder** brukes kun unntaksvis.

Alle systemiske soppisolater blir resistensbestemt.

1. Vi benytter **MIC-gradienttest** (E-test) og **RPMI medium med MOPS** til MIC bestemmelse av antimykotika.
2. Vi samarbeider med Statens Seruminstittutt i København for verifisering av antatt ervervet resistens hos *Candida* og videresender isolat til **buljongfortynning (mikrotiterplateteknikk)**, og for genetisk påvisning av echinocandinresistens hos candidaarter, metoder som av kapasitetshensyn fortsatt ikke er implementert i rutinen hos oss.
3. Påvisning av azolresistens hos *Aspergillus fumigatus*. In-house metode for genetisk påvisning av azolresistens ved hjelp av sekvensering av CYP51 genot hos *Aspergillus* sp. De vanligste genvariantene ved azolresistens er TR₃₄/L98H og TR₄₆/Y121F/T289A. Metoden ble innført i 2015 og vi har funnet begge variantene i kliniske *Aspergillus fumigatus* isolat fra norske pasienter. Vi planlegger verifisering av en fenotypisk *screeningtest* med brytningspunksagar (VIP check) for påvisning azolresistens i 2018.

Mikroskopi:

1. **Calcofluorwhite farging** (BD diagnostics): Fargemetoden benyttes for påvisning av soppelenter i vev.
2. **Pneumocystis immunfluorescens mikroskopi** (MONOFLUO Pneumocystis carinii IFA, Bio-Rad) utføres rutinemessig på PCP PCR moderat- eller sterkt positive prøver.
3. **Giemsa farging** kan benyttes til påvisning av dimorf sopp i benmarg.

4. **KOH mikroskopi (10 % kalilut):** Benyttes oftest sammen med Calcofluorwhite.

Påvisning av sopp DNA:

Spesifikke PCR analyser til bruk direkte på prøvematerialet:

1. **Påvisning av *Aspergillus sp* DNA og *Aspergillus fumigatus* DNA ved PCR:** In-house metode. Analysene gjøres vanligvis parallelt og fortrinnsvis på sterilt materiale og i BAL som et supplement til galaktomannan.
2. **Påvisning av *Mucorales* DNA:** In-house PCR som påviser DNA fra *Rhizomucor sp*, *Lichtheimia sp* og hhv *Mucor sp* eller *Rhizopus sp* med 3 ulike prober direkte i prøvematerialet (BAL, spinalvæsker, biopsier og annet fortrinnsvis sterilt vev).
3. **Påvisning av *Pneumocystis jirovecii* DNA:** In-house PCR som tilbys alle hverdager. Prøver med Ct verdi ≥ 28 anses som svak positive, ≥ 22 til < 28 som moderat positive og < 22 som sterk positive. Påfølgende IF mikroskopi gjøres på moderat - og sterkt positive prøver.
 - a. **Påvisning av resistensgener i *Pneumocystis jirovecii*:** Validering av metode gjennomført, men analysen er lite etterspurt i rutinen.
4. **Påvisning av sopp DNA direkte i prøvematerialet:** Der sopp *ikke* påvises ved spesifikke PCR analyser kan sopp DNA påvises direkte på prøvematerialet ved påvisning av ulike målgener som er felles for de fleste sopparter, men som også har en variabilitet som muliggjør artsidentifikasjon. I 2014 byttet vi fra målgenene 18s og ITS1 til **ITS2 og D1D2**. Dersom sopp DNA påvises gjøres en sekvensering og gensekvensene sammenlignes med tilsvarende sekvenser i internasjonale databaser for sopp, fortrinnsvis **ISHAM** og **NCBI BLAST**. Analysene utføres IKKE utføres på materialer der sopp inngår som en del av normalfloraen.
5. **Påvisning av Dermatofytt DNA:** Pan-dermatofytt PCR med SYBRGreen og analyse av smeltepunkt for artsbestemmelse. Vi har også validert **en spesifikk Trichophyton PCR** som supplement til eksisterende PCR for å identifisere *T. rubrum* og *T. mentagrophytes/interdigitale*.

Serologi:

1. **Presipiterende antistoffer mot *Aspergillus fumigatus*** (*A. fumigatus* ID ANTIGEN fra IMMY). Påvisning av presipiterende antistoffer mot *Aspergillus fumigatus* ved motstrømselektroferese. Positive prøver titreres.
2. Ved mistanke om allergisk alveolitt kan vi også påvise **antistoff mot fugleantigener** (due, høns, undulat) i tillegg til *Aspergillus* antistoffer med samme metode.
3. **Presipiterende antistoffer mot dimorfe sopparter.** (ID - Fungal antibody System, IMMY) Vi påviser presipiterende antistoff mot *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* og *Coccidioides immitis*.

Antigenpåvisning:

1. **Galaktomannan (*Aspergillus* antigen) påvisning.** (Platelia™ *Aspergillus* Antigen Bio-Rad Laboratories AB). ELISA test for påvisning av antigen. Analysen svares ut som tallverdi, indeks, som angir ratio i forhold til en intern kontroll. Cut off er 0,5.

- a. Screeningstest i serum mtp invasiv aspergillose for utvalgte høyrisikopasienter som ikke får profylakse.
 - b. Analysen benyttes som supplement til annen utredning ved mistanke om *invasiv* aspergillose hos immunsupprimerte pasienter, og er «surrogatmarkør» for invasiv aspergillusinfeksjon i serum, BAL og spinalvæske hos disse. Hos pasienter *uten* nøytropeni er undersøkelse av BAL spesielt viktig da galaktomannan i serum ofte er negativ og *ikke* utelukker invasiv aspergillose hos disse pasientene. Analysen benyttes fortrinnsvis på pasienter som er immunsupprimert, og utføres kun unntaksvis uten kliniske opplysninger.
2. **Kryptokokkantigen:** Vi benytter 2 ulike metoder. Hurtigdiagnostikk med immundiffusjon (IMMY) i serum, spinalvæske og eventuelt BAL. Alle positive serumprøver og spinalvæsker titreres ved hjelp av en agglutinasjonstest (Orion Diagnostica, Espoo, Finland).

Epidemiologiske data, bistand til overvåking, beredskap og respons ved utbrudd av smittsomme sykdommer

Soppinfeksjoner er ikke rapporteringspliktige til MSIS med mindre de inngår som AIDS definerende infeksjon (kryptokokk- eller *Pneumocystis jirovecii* infeksjon)

Alle gjærsoppisolater fra blodkultur fra alle norske mikrobiologiske laboratorier sendes til Det nasjonale referanselaboratoriet for endelig identifikasjon og resistensbestemmelse. Referanselaboratoriet rapporterer årlig til NORM, og artsdistribusjon og resistensdata publiseres årlig, se [NORM NORM-VET 2016](#). Med støtte i disse data er det publisert epidemiologiske candidemidata i Norge fra 1991-2012.

I 2017 mottok Referanselaboratoriet 203 unike soppisolat fra 195 fungemiepisoder hos 185 pasienter. 6 av episodene var med non-candida arter. Ved 5 av fungemiene var det funn av to eller flere ulike sopparter. 4 pasienter hadde residiverende soppinfeksjon, hvorav 1 pasient med 6 residiverende infeksjoner med mer enn 4 ukers mellomrom.

Det finnes ingen epidemiologisk oversikt over andre alvorlige soppinfeksjoner i Norge. Dyrkning er lite sensitivt, og spesifisiteten ved oppvekst er også varierende i ulike prøvematerialer og pasientgrupper. Gullstandard er histopatologisk eller mikroskopisk påvisning av soppelamenter i vev eller oppvekst i blod, men slik diagnostikk blir ofte utelatt grunnet frykt for komplikasjoner og blodkulturer er oftest negative med unntak av ved candidemi. Opptelling av dyrkningspositive prøver alene gir ingen oversikt over epidemiologien. Annen diagnostikk kan heller ikke estimere forekomst av de aktuelle infeksjonene og studier er helt avgjørende for å få bedre kjennskap til epidemiologiske forhold.

Antallet *tilsendte* muggsoppisolat er lavt, 71 i 2017. 60 % av isolatene er ulike Aspergillusarter, hvorav 27 *A.fumigatus* (38 %). Muggsoppinfeksjoner er alvorlige infeksjoner hvor riktig artsidentifikasjon kan rettlede behandlingsvalg. Det er økende bekymring internasjonalt over ervervet azolresistens hos *Aspergillus fumigatus* påvist hos pasienter som ikke har fått behandling, og det er vist at slik resistens kan oppstå i miljøet.

Vi ønsker å få tilsendt alle invasive isolat og muggsoppisolat fra potensielt systemiske infeksjoner og isolat fra pasienter hvor kliniker planlegger behandling med antimykotika.

Vi mottar et stort antall prøver til påvisning av galaktomannan og Aspergillus PCR, men heller ikke dette sier noe om insidensen av invasiv sykdom da dette er "markører" for sykdom *eller* fravær av sykdom avhengig av problemstilling, klinikk og andre parametere. Tilsvarende gjelder betydningen av Mucorales DNA som i 2017 ble påvist i 13 av 256 prøver mot 31 av 224 prøver i 2016.

I 2017 mottok vi 1308 prøver til påvisning av *Pneumocystis jirovecii* DNA og utførte 188 IF mikroskopier på moderat positive og sterkt positive prøver. Vi påviste cyster ved mikroskopi i 29 prøver, dette er diagnostisk for PCP, men underestimerer reell forekomst av infeksjon hos pasienter som ikke er HIV positive, da forekomsten av cyster er lav hos hematologiske pasienter og pasienter fra andre risikogrupper enn AIDS. Man antar at små mengder DNA kan være uttrykk for kolonisering uten kjennskap til hvor «cut-off» for infeksjon ligger. Vi håper at muligheten til å påvise betaglukan i serum kan bidra til å skille mellom infeksjon og kolonisering med *Pneumocystis jirovecii*.

Dermatofytt PCR har i økende grad erstattet dyrkning som diagnostikk av dermatofyttinfeksjoner og utføres nå av stadig flere laboratorier. Vi mottar stadig færre prøver til DNA påvisning. For de laboratoriene som fortsatt dyrker dermatofytter har innføring av MALDI-TOF også redusert behovet for hjelp til identifikasjon, i 2017 mottok vi bare 13 isolat. Vi utfører fortsatt noen få primære dermatofytt dyrkninger, især ved uventet negativ PCR, og søker å bevare kompetansen på dermatofytter og dermatofyttinfeksjoner i laboratoriet.

Antall isolat mottatt eller analyser utført	2014	2015	2016	2017
Gjærsoppisolat fra blod til identifisering og resistensbestemmelse (unike isolat)	262 (209)	240 (203)	248 (220)	239 (203)
Gjærsoppisolat fra andre lokalisasjoner	183	191	146	188
Tilsendte muggsoppisolat	73	79	78	74
Dermatofytter: Tilsendte isolater	27	32	17	14
Dermatofytt dyrkning (ikke tilsendte isolat)	81	54	45	55
Langtidsdyrkning sopp	246	149	128	62
Calcofluorwhite mikroskopi	218	166	169	147
Bromthymol-cotton-blue mikroskopi	212	239	279	381
Pneumocystis IF	126	179	218	188
<i>Pneumocystis jirovecii</i> PCR	796	898	1255	1308
Dermatofytt PCR	1270	990	842	823
<i>Aspergillus sp</i> PCR	337	664	1024	1102
<i>A. fumigatus</i> PCR	333	661	1017	1101
Mucorales PCR		11	224	256
Direkte påvisning av sopp DNA (ITS2+D1D2 rDNA og sekvensering)	572	440	395	291
<i>A. fumigatus</i> (presipiterende) antistoff	112	141	178	195
Antistoff mot fugleantigen	8	9	12	14
Antistoff mot dimorfe sopparter	21	39	37	36
Galaktomannan	1911	2179	2543	2754
Kryptokokkantigen	111	130	163	177

Samling av stammer og annet referansemateriale, eventuelle biobanker med tilhørende tillatelser

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.

Vitenskapelig råd og støtte

De ansatte på referanselaboratoriet søker aktivt å videreformidle kjennskap til diagnostikk ved soppinfeksjoner til klinikere både i og utenfor OUS. Referanselaboratoriet får stadig henvendelser fra laboratorier, kollegaer og andre som søker råd om diagnostikk og behandling av soppinfeksjoner, eller problemer knyttet til medisinsk mykologi.

Vi mottar hospitanter fra andre laboratorier som ledd i kompetanseoppbygging av bioingeniører og leger i spesialisering. Representanter fra referanselaboratoriet holder foredrag og undervisning og arrangerer jevnlig kurs innen medisinsk mykologi. Resistensbestemmelse av sopp ble i 2017 gjeninnført som tema på det årlige AFA kurset.

Vi samarbeider også med andre laboratorier blant annet vedr kontrollstammer for dermatofytt PCR og gir råd vedrørende implementering av metoder relatert til mykologi.

Samarbeid og forskning

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 referanselaboratoriet.

Avdelingen har også publisert en elektronisk brukerhåndbok i mikrobiologi hvor analysene som tilbys ved referanselaboratoriet er beskrevet, se www.ousmik.no

Referanselaboratoriet deltar i arbeidet for standardisering av brytningspunkter for soppmidler gjennom EUCAST, vi har representant i AFA og nasjonal representant i EUCAST-AFST.

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. Alle resultater av identifisering og resistensbestemmelse rapporteres tilbake til rekvirerende laboratorium.

Referanselaboratoriet samarbeider med ulike forskningsgrupper i og utenfor OUS, som avdelingens PBS-gruppe (parasitter, bakterier og sopp), forskningsnettverket Turning the Tide of Antimicrobial resistance (TTA) i OUS, og det nasjonale nettverket av mikrobiologer, infeksjonsmedisinere og pediatere i Norwegian Fungal Network.

I samarbeid med Norwegian Fungal Network og Regionalt forskningsnettverk for

invasive soppinfeksjoner har doktorgradsstipendiat Liv Hesstvedt et pågående prosjekt vedrørende karakterisering og resistensbestemmelse av alle invasive candidaisolat i Norge, samt innhenting av epidemiologiske data fra samtlige pasienter > 18 år med candidemi. Fungal Network ledes av infeksjonsmedisiner og mikrobiolog Ingvild Nordøy.

I 2017 innledet vi et samarbeid med The European Pediatric Mycology Network (EPMyn) bestående av barneleger fra ulike europeiske institusjoner og har bidratt med epidemiologiske data til EUROCANDY studien som ser på candidemier hos barn i Europa 2005-2015. Studien er en retrospektiv europeisk multisenterstudie som inkluderer barn ved 25 store sykehus i 10 europeiske land. Alle pasienter < 18 år med candidemi innlagt på Oslo Universitetssykehus i studieperioden er inkludert.

I 2017 innledet vi et samarbeid med Veterinærinstituttet, Norsk institutt for bioøkonomi (NIBIO), Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), Norsk Landbruksrådgiving (NLR), Mattilsynet, Radboud University Nijmegen Medical Center (RUNMC), Nederland og Statens Serum Institut (SSI), Danmark. Nettverket har fått bevilget penger fra Forskningsrådet til et tenketankprosjekt om azoleresistens (Interdisciplinary think tank to minimize the emergence and spread of antifungal resistance - ResAzoleNet). Vi skal sammen belyse og samle kunnskap om azoleresistens i et én helse-perspektiv og identifisere kunnskapshull og forskningsbehov. Prosjektleder er Ida Skaar ved Veterinærinstituttet. I første omgang vil vi prøve å nå fram til relevante nasjonale og internasjonale myndigheter og interessenter og prosjektet avsluttes med en internasjonal konferanse for å dele kunnskap og diskutere utfordringer og nye strategier, parallelt som det søkes midler til forskning.

Organisatoriske-, administrative- og ressursmessige forhold knyttet til referansefunksjonen samt forutsetninger for videre drift

Referansefunksjonen mottar ikke særskilt finansiering fra eget HF/RHF. Lonny Margrethe Kløvfjell er fagansvarlig bioingeniør, Cecilie Torp Andersen er fagansvarlig overlege for referanselaboratoriet og er norsk representant i EUCASTs Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST). Førsteamanuensis Jørgen Vildershøj Bjørnholt er forskningsansvarlig overlege.

I tillegg til fagansvarlig bioingeniør ruller 3 bioingeniører fra bakteriologisk enhet på Rikshospitalet til oppgaver på referanselaboratoriet, og bioingeniører fra seksjon for virologi og infeksjonsimmunologi (VIM) utfører galaktomannan og kryptokokkantigentester. Vi samarbeider også med andre seksjoner som utviklingsseksjonen for kontinuerlig forbedring av vår soppdiagnostikk.

Leger og bioingeniører tilknyttet referansefunksjonen utfører oppgavene i tillegg til andre oppgaver ved Avdeling for mikrobiologi.

Referanselaboratoriet planlegger å implementere EUCAST buljongfortynning som referansemetode ved resistensbestemmelse av gjærsopp og å innføre genetisk påvisning av echinocandinresistens hos Candida (FKS gen sekvensering).

Innføring av metode for påvisning av 1,3 beta-3 glukane i serum planlegges etter at verifisering av analysen avsluttes primo 2018. 1,3 beta-3 glukane er en "pan-sopp"

markør i serum til screening av risikopasienter. Påvisning av 1,3 beta-3 glukon vil dessuten sammen med semi-kvantitativ 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.

Vi implementerer prober for å identifisere *T. rubrum* og *T. mentagrophytes/interdigitale* som en tilleggsanalyse til nåværende Pan-dermatofytt PCR primo 2018.

Det har lenge vært ønskelig å innføre nye målgener ved sekvensering av muggsopp. Beta-tubulin vil bli prioritert i 2018 for bedret identifikasjon til artsnivå innen de ulike *Aspergillus* kompleksene.

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

Publikasjoner

Hesstvedt L, Arendrup MC, Poikonen E, Klingpor L, Friman V, Nordøy I; Swedish fungal Surveillance Group Collaborators. **Differences in epidemiology of candidaemia in the Nordic countries - what is to blame?** Mycoses. 2017 Jan;60(1):11-19.

Håvelsrud OE, **Gaustad P** (2017)

Draft Genome Sequences of Candida glabrata Isolates 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, and 3B
Genome Announc, 5 (10)

Vikum D, Nordøy I, **Andersen CT**, Fevang B, Line PD, Kolrud FK, Aukrust P, Buanes T (2017)

A Young, Immunocompetent Woman with Small Bowel and Hepatic Mucormycosis Successfully Treated with Aggressive Surgical Debridements and Antifungal Therapy

Case Reports in Infectious Diseases, 2017, 4173246

NORM/NORM-VET 2016. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. Tromsø / Oslo 2017. ISSN:1502-2307 (print) / 1890-9965 (electronic). Side 127-129

Oslo 20.03.2018,

Cecilie Torp Andersen
Fagansvarlig overlege
(sign)

Fredrik Müller
Avdelingsleder, professor
(sign)