

## Årsrapport for 2018: Det nasjonale referanselaboratoriet for medisinske sopp sykdommer

Referanselaboratoriet ble formelt opprettet ved Mikrobiologisk institutt ved Rikshospitalet 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*, *Cryptococcus gattii*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Blastomyces* og *Talaromyces marneffeii* svært sjeldne.

### 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 (redgjør for eventuelle endringer)

Referanselaboratoriet utfører **identifikasjon og resistensbestemmelse mot antimykotika** for ulike sopparter tilsendt fra andre laboratorier. Vi tilbyr dessuten ulike analyser på tilsendte pasientprøver og på prøver fra OUS Rikshospitalet, men må av kapasitetshensyn innstendig be primærlaboratoriene om å utføre vanlige soppdyrkinger på egne prøver med mindre lite prøvemateriale gjør deling mellom oss og primærlaboratoriet umulig. **Vi har dessverre ikke kapasitet til rutinemessig å utføre vanlig sopp- og muggsoppdyrking, ei heller Actinomyces- eller Nocardia dyrkning for andre laboratorier.**

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:

#### **Gjærsopp**

Ved primær dyrkning av gjærsopp inkuberes Sabouraudskåler 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.

#### **Muggsopp**

Primær dyrkning av muggsopp-prøver utføres på Sabouraudskåler som inkuberes ved 28 og 37 °C i 5-28 dager avhengig av problemstilling.

#### **Langtidsdyrkning av sopp**

Som ved muggsoppdyrkning, evt. med anrikningsbuljong.

#### **Sopp langtidsdyrkning med buljonganrikning**

Vev dyrkes i Heart-infusion-buljong (HIB) i 48 timer, deretter sekundærutsæd til 2 Sabouraudskåler som inkuberes som over i 28 døgn.

#### **Dermatofytter**

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

Ved mottak av isolater til identifikasjon og resistensbestemmelse benyttes skåler som angitt over avhengig av agens.

### **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, og er tatt i bruk i rutinen 2018/19.
2. **Vekstbetingelser, morfologi og mikroskopi:** For identifikasjon av dermatofytter og muggsopp er dette fortsatt viktige, men tidkrevende hjelpemidler 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 **Laktofenolblått** (Lactophenol solution, Merck) viktig for riktig artsidentifikasjon, eventuelt benyttes tilsvarende farging av nålepreparat.
3. **Sekvensering av soppisolat.**

- a. **ITS2** sekvensering på kulturer benyttes ved vanskelig eller ikke entydig identifisering av ulike sopparter.
  - b. **D1D2** benyttes ved behov for bedret artsidentifikasjon.
  - c. 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 *Candida*arter, 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 gen** hos *Aspergillus sp*. De vanligste genvariantene ved azolresistens er TR<sub>34</sub>/L98H og TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A.
4. Fenotypisk påvisning av azolresistens hos *Aspergillus fumigatus* med brytningspunktsagar (VIP CHECK™) verifisert i 2018.

#### Mikroskopi:

1. **Calcofluorwhite farging** (BD diagnostics): Fargemetoden benyttes for påvisning av soppelerner i vev.
2. **Pneumocystis immunfluorescens mikroskopi** (MONOFLUO Pneumocystis carinii IFA, Bio-Rad) utføres rutinemessig på PCP PCR moderat- eller sterkt positive prøver. Monoklonalt anti-Pneumocystis antistoff konjugert til fluorescein-isothiocyant (FITC) binder seg til alle former av *Pneumocystis jirovecii* (cyster, sporozoitter, trophozoitter og extracellulær matrix).
3. **Giemsa farging** kan bla 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-metode med 3 ulike prober som påviser DNA fra *Rhizomucor sp*, *Lichtheimia sp* og hhv *Mucor sp* eller *Rhizopus sp* direkte i prøvematerialet (BAL, spinalvæsker, biopsier og annet fortrinnsvis sterilt vev).

3. **Påvisning av *Pneumocystis jirovecii* DNA:** «In-house» PCR-metode som tilbys alle hverdager. Prøver med Ct verdi  $\geq 28$  anses som svak positive,  $\geq 22$  til  $< 28$  som moderat positive og  $< 22$  som sterk positive. Påfølgende IF mikroskopi gjøres på moderat - og sterkt positive prøver.
4. **Påvisning av *Pneumocystis jirovecii* resistensgener:** Validering av metode gjennomført, men analysen er lite etterspurt og ikke implementert i rutinen.
5. **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 på materialer der sopp inngår som en del av normalfloraen.
6. **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* nøythropeni 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 eller med klinisk mistanke om kronisk pulmonal aspergillose (CPA) 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).
3. **Beta-glukan** (Fungitell Assay, Associates of Cape Cod Inc.). **Ny analyse desember 2018;** Pan-fungal test til påvisning av infeksjon med *Candida*, *Aspergillus* og *Pneumocystis* infeksjon hos pasienter med svekket immunforsvar. Mucorales og kryptokokkarter har lite (1-3)- $\beta$ -D-Glukan i cellevggen, og både falsk negative og falske positive prøver forekommer. Prøvesvar gis ut i pg/ml og «Påvist»/ «Ikke påvist». Teknisk cut-off for analysen er 70 pg/ml  
Positiv:  $\geq 80$ pg/ml  
Negativ:  $< 60$ pg/ml og  
Gråsoner: 60-79pg/ml

### Vorikonazol og posakonazol serumkonsentrasjonsmålinger

Utføres av Avd for farmakologi, Rikshospitalet. Se [www.anx.no](http://www.anx.no)

## 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).

Det finnes ingen epidemiologisk oversikt over ulike alvorlige soppinfeksjoner i Norge. Dyrkning er lite sensitivt, og spesifisiteten ved dyrkning og vekst av sopp er også varierende i ulike prøvematerialer og pasientgrupper. Gullstandard er oppvekst i blod eller histopatologisk eller mikroskopisk påvisning av soppelamenter i vev, men invasiv diagnostikk blir ofte utelatt grunnet frykt for komplikasjoner ved prøvetaking. Blodkulturer antas å ha en sensitivitet på 50 % ved candidemi, men er oftest negative ved lokaliserte invasive candidainfeksjoner og ved andre soppinfeksjoner. Opptelling av dyrkningspositive prøver alene eller annen diagnostikk gir ingen fullgod oversikt over epidemiologien ved soppinfeksjoner. Studier er helt avgjørende for å få bedre kjennskap til epidemiologiske forhold. Det ble publisert et estimat over forekomsten av soppinfeksjoner i Norge i 2018 (1), men bare gode studier prospektive kan gi oss bedre oversikt over problemets omfang.

Alle gjærsoppisolater fra blodkultur fra alle norske mikrobiologiske laboratorier sendes til Det nasjonale referanselaboratoriet for medisinske sopp sykdommer for endelig identifikasjon og resistensbestemmelse.

Referanselaboratoriet rapporterer forekomst av Candida i blodkultur til NORM, og artsdistribusjon og resistensdata publiseres årlig, se [NORM NORM-VET 2017 \(pdf\)](#). Med støtte i disse data er det også publisert flere artikler med epidemiologiske candidemidata i Norge fra perioden 1991-2012.

### Gjærsopp:

I 2018 mottok Referanselaboratoriet 197 unike soppisolat fra fungemiepisoder hos 178 pasienter hvorav 6 isolat fra non-candida fungemier. (2 *Cryptococcus neoformans*, 2 *Rhodotorula mucilaginosa*, 1 *Magnusiomyces capitatus* (*Geotrichium capitatus*) og en *Saccharomyces cerevisiae*.) Ved 3 av candidemiene forelå dobbeltinfeksjon med *C.albicans* og hhv *C.nivariensis*, *C.tropicalis* og *C.parapsillosis*. 6 pasienter hadde residiverende soppinfeksjoner, hvorav 1 pasient med ny art og hele 5 pasienter med residiverende infeksjoner med samme art med mer enn 4 ukers mellomrom. Ervervet echinocandinresistens ble påvist i 3 isolat, 2 *C.albicans* og en *C.tropicalis*, dessuten påviste vi ervervet flukonazolresistens i et *C.tropicalis* isolat. Endelig oversikt over artsdistribusjon og resistens publiseres i NORM rapporten for 2018.

### Muggsopp:

Vi ønsker å få tilsendt *alle* invasive isolat og muggsoppisolat fra potensielt systemiske infeksjoner og isolat fra pasienter hvor kliniker planlegger behandling med antimykotika, men antallet *tilsendte* muggsoppisolat er fortsatt lavt. I 2018 mottok vi 92 isolat mot 71 i 2017.

Ulike Aspergillusarter er hyppigst (54 %). Vi mottok 37 *A.fumigatus* isolat fra hele landet.

Muggsoppinfeksjoner er alvorlige infeksjoner hvor riktig artsidentifikasjon kan rettlede behandlingsvalg, men økende azolresistens hos *Aspergillus fumigatus* skaper bekymring internasjonalt. Ervervet azolresistens hos *A. fumigatus* påvises hos pasienter som ikke har fått behandling. Det er vist at slik resistens *kan* oppstå i miljøet og problemet er assosiert med bruk av plantevernmidler. Azoler benyttes som plantevernmidler og bruk av disse azolene også kan medføre azolresistens mot medisinske azoler hos *A.fumigatus*. I Nederland påvises slik resistens hos opp til 30 % av alle *A.fumigatus* påvist i pasientprøver. Vi har også påvist genvariantene TR<sub>34</sub>/L98H og TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A som er assosiert med plantevernmidler i Norge. I 2018 påviste vi 5 azolresistente isolat fra 2 pasienter. Den ene pasienten sto på langvarig behandling, den andre var azolnaiv, med kjent genmutasjon som oppstår i miljøet (TR<sub>34</sub>/L98H).

Påvisning av galaktomannan (Aspergillus antigen), *Aspergillus fumigatus* DNA og *Aspergillus sp* DNA benyttes som støtte i diagnostikk av aspergillusinfeksjoner, som "markører" for sykdom *eller* fravær av sykdom avhengig av klinisk problemstilling, klinikk og andre parametere. Analysene kan ikke alene benyttes til å beregne insidensen av invasiv sykdom. Tilsvarende gjelder betydningen av Mucorales DNA.

Av 3093 prøver til galaktomannan i 2018 var 90 % av er negative, (92 % negative i serum og 70 % i annet materiale). Vi fant *Aspergillus fumigatus* DNA i 102 av 1225

prøver og *Aspergillus sp* DNA i 192 av 1221 prøver. Mucorales DNA ble påvist i 20 av 241 prøver i 2018 mot 13 av 256 prøver i 2017, men antallet gir heller ikke her epidemiologisk oversikt over denne typen infeksjoner.

Behovet for påvisning av sopp DNA direkte i prøvematerialet ved hjelp av ITS2 og D1D2 PCR og sekvensering er litt avtagende (440 i 2018) og erstattes til dels av raskere, mer sensitive og mindre arbeidskrevende PCR metoder. Vi utførte totalt 232 soppsekvenseringer i 2018, fordelt på identifikasjon av koloni og positiv sopp DNA direkte i prøvematerialet.

Vi ser en økning i antallet prøver til påvisning av *Pneumocystis* DNA med PCR på tross av at flere laboratorier nå tilbyr samme analyse. I 2018 mottok vi 1355 prøver til påvisning av *Pneumocystis jirovecii* DNA og utførte 199 IF mikroskopier på moderat positive og sterkt positive prøver mot hhv 1308 og 188 i 2017. 79 av prøvene i 2018 var sterk positive med Ct verdi under 22. Vi påviste bare cyster i 20 prøver. Påvisning av cyster ved mikroskopi 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 pasienter med 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 beta-glukan 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 av mange laboratorier, men vi mottar fortsatt vel 900 prøver til direkte DNA påvisning hvert år og antallet er stabilt. For de laboratoriene som fortsatt dyrker dermatofytter har innføring av Maldi-TOF også redusert behovet for hjelp til identifikasjon, i 2018 mottok vi bare 17 slike 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	2018
Gjærsoppisolat fra blod til identifisering og resistensbestemmelse (unike isolat)	262 (209)	240 (203)	248 (220)	239 (203)	232
Gjærsoppisolat fra andre lokalisasjoner	183	191	146	188	187
Tilsendte muggsoppisolat	73	79	78	74	92
Dermatofytter: Tilsendte isolater	27	32	17	14	17
Dermatofytt dyrkning (ikke tilsendte isolat)	81	54	45	55	42
Langtidsdyrkning sopp	246	149	128	62	108
Calcofluorwhite mikroskopi	218	166	169	147	199
Bromthymol-cotton-blue mikroskopi	212	239	279	381	388
Pneumocystis IF	126	179	218	188	199
<i>Pneumocystis jiroveci</i> PCR	796	898	1255	1308	1355
Dermatofytt PCR	1270	990	842	823	917
<i>Aspergillus sp</i> PCR	337	664	1024	1102	1225
<i>A. fumigatus</i> PCR	333	661	1017	1101	1221
Mucorales PCR		11	224	256	241
Direkte påvisning av sopp DNA (ITS2+D1D2 rDNA)	572	440	395	582	446
Soppsekvensering totalt			192	291	232
<i>A. fumigatus</i> (presipiterende) antistoff	112	141	178	195	240
Antistoff mot fugleantigen	8	9	12	14	11
Antistoff mot dimorfe sopparter (prøver)	21	39	37	36	60
Galaktomannan	1911	2179	2543	2754	3093
Kryptokokkantigen	111	130	163	177	134

## Funn og epidemiologiske data med aktuelle trender (over år) i tabells form

Se [NORM NORM-VET 2017 \(pdf\)](#)

## 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 vedrørende 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](http://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](http://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 infeksjonsmedisinere 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 EURO CANDY 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.

Fra 2017 har vi deltatt i et nettverksprosjekt finansiert av Forskningsrådet; «Tverrfaglig tenketank for å minimere fremvekst og spredning av antifungal resistens» (ResAzoleNet) som leverte rapporten «Knowledge and knowledge gaps on azole resistance in a One Health perspective» i februar 2019. ([Last ned rapporten](#)). Prosjektet arrangerte en tverrfaglig konferanse i januar 2019 for å dele kunnskap og diskutere utfordringer og nye strategier. Samarbeidet 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 fortsetter og det søkes midler til nødvendig forskning.

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

Referansefunksjonen har aldri mottatt særskilt finansiering fra eget HF/RHF. Leger og bioingeniører tilknyttet referansefunksjonen utfører oppgavene i tillegg til andre oppgaver ved Avdeling for mikrobiologi. Manglende finansiering gjør at vi ikke har kapasitet til å ta opp oppgaver som burde ligge under referansefunksjonen, oppgaver som besluttes tatt opp bruker vi lang tid på å implementere da virksomheten til denne referansefunksjonen konkurrerer med svært mange andre funksjoner og oppgaver avdelingen er pålagt. En stilling (fagbioingeniør/ingeniør) øremerket referansefunksjonen ville gitt muligheter for å sikre etablering av ny metodikk, øke kapasitet til å ta imot isolater fra andre laboratorier og styrke gjennomføringen av viktige prosjekter som beskrevet nedenfor samt høyne kvaliteten på videre drift av referansefunksjonen.

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.

Lonny Margrethe Kløvfjell var fagansvarlig bioingeniør til hun sluttet hos oss 1.7.18. Hennes stedfortreder Aina Myhre har overtatt som fagansvarlig bioingeniør. Referanselaboratoriet har i 2018, liksom bakteriologisk enhet ved Rikshospitalet hatt driftsmessige utfordringer knyttet til bioingeniørbemanning både grunnet permisjoner, sykemeldinger og oppsigelser. Opplæring i medisinsk mykologi er tidkrevende, og utfordringen med opplæring blir svært stor når også samarbeidende bakteriologisk enhet sliter med bemanning.

Vi samarbeider med mange seksjoner i avdelingen for kontinuerlig forbedring av vår soppdiagnostikk. Soppsekvenseringer utføres ved vår utviklingsseksjon og bioingeniører ved bakteriologisk enhet på Rikshospitalet utfører et økende antall spesifikke DNA analyser. Bioingeniører fra seksjon for virologi og infeksjonsimmunologi (VIM) utfører også et stadig økende antall soppanalyser (galaktomannan,

kryptokokkantigentester og beta-glukan). Alt dette er resurskrevende manuelle analyser. Det er også driftsutfordringer knyttet til permisjoner, sykemeldinger og samtidig økning av det totale analyseomfanget (5,5 %) på denne enheten. Det er derfor gledelig at vi på tross av kapasitetsutfordringer har fått implementert analysen beta-glukan i serum i 2018.

Ressurstilgang er en gjentakende problemstilling. Referanselaboratoriet ønsker å implementere EUCAST buljongfortynning som referansemetode ved resistensbestemmelse av gjærsopp og å innføre genetisk påvisning av echinocandinresistens hos *Candida* (*fk*s-gen sekvensering). Dette arbeidet settes stadig på vent grunnet kapasitetsutfordringer. Det har lenge vært ønskelig å innføre nye målgener ved sekvensering av muggsopp. Beta-tubulin gir bedret identifikasjon til artsnivå innen de ulike *Aspergillus* kompleksene og valideringen skulle bli prioritert i 2018, men arbeidet ble av kapasitetshensyn flyttet til 2019. Det er dessuten ønskelig å kunne implementere en PCR-metode for påvisning av *Candida* DNA direkte på prøvematerialet.

Med økende bekymring for azolresistent *A.fumigatus* er det ønskelig med en bedre overvåkning av forekomst av slik resistens i Norge. Vi finner årlig 120-130 *A. fumigatus* isolat i egne pasientprøver (Rikshospitalet), og får tilsendt 30-40 isolat fra andre laboratorier. De siste 5 årene er det utført resistensbestemmelse av ca 100 *A. fumigatus* stammer årlig. Vi har ikke hatt kapasitet til å følge opp anbefalingen fra strategirapporten i 2013 som sa at *alle* klinisk relevante *Aspergillus*-isolater bør sendes til referanselaboratoriet.

Siden dette strategimøtet har vi uten innføring av screening påvist azolresistent *A.fumigatus* fra 5 azolnaive pasienter, isolater med samme de samme genvariantene som er assosiert med resistens oppstått i miljøet (TR<sub>34</sub>/L98H og TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A). 4 av 5 isolat var tilsendt fra andre sykehus i Norge. Til sammenligning har vi bare påvist ervervet azolresistens i gjentatte prøver fra en pasient på langvarig azolbehandling, også disse fra annet sykehus.

Vi mener det er viktig å følge denne utviklingen nøye. I Nederland har man i noen sykehus opp til 30 % azolresistente stammer i pasientprøver, og det er ikke uvanlig med 5-10 % resistente stammer i kliniske prøver og miljøprøver i mange europeiske land. I Norge har vi påvist resistens i vel 1 % av de 500 kliniske stammer vi har undersøkt, men dette er langt fra en nasjonal overvåkning. Vi vet at azolresistent *A. fumigatus* eksisterer også hos oss. Det er svært bekymringsfullt dersom kritisk syke, immunsvekkede pasienter får infeksjon med resistente stammer da de er avhengig av azoler for optimal behandling.

Som referanselaboratorium ønsker vi å tilby nødvendig diagnostikk og ha resurser til adekvat håndtering av problemer knyttet til mykologi og resistens, men med dagens

manglende finansiering er dette vanskelig.

## Publikasjoner

Nordøy, I, Hesstvedt L, **Andersen CT**, Mylvaganam H, Kols NI, Falch BM, Tofteland S, **Müller F**, Denning DW, *An Estimate of the Burden of Fungal Disease in Norway*. J Fungi (Basel), 2018. 4(1).

*NORM/NORM-VET 2017. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial resistance in Norway*, in *NORM/NORM-VET 2018*: Tromsø/Oslo.

Oslo 29.03.2019

Cecilie Torp Andersen

Overlege  
(sign)

Jørgen Vildershøj Bjørnholt

Overlege, Førsteamanuensis  
(sign)

Fredrik Müller

Avdelingsleder, Professor  
(sign)