Oslo universitetssykehus

Oslo universitetssykehus
Postboks 4956 Nydalen
0424 Oslo

Klinikk for laboratoriemedisin
Avdeling for mikrobiologi

Årsrapport for 2022: Det nasjonale referanselaboratorium for medisinske soppsykdommer

Referanselaboratoriet ble formelt opprettet ved Mikrobiologisk institutt, RR-HF etter vedtak i Helse- og omsorgsdepartementet 3/12-05. Det fulgte ingen midler eller stillinger med denne tildelingen.

Agens

Sopp tilhører et eget rike med eukaryote, heterotrofe organismer som bryter ned og tar opp næringsstoffer fra omgivelsene. Arter innen medisinsk mykologi utgjør bare en svært liten andel. Sopp formerer seg kjønnet eller ukjønnet ved hjelp av sporer eller ukjønnet ved knoppskyting. Basert på vekstform blir sopp ofte beskrevet som gjærsopp eller filamentøs sopp. Eldre systematisk inndeling baserer seg i stor grad på morfologiske forhold knyttet til kjønnet formering, hvordan soppsporene dannes og deres plassering. De fleste medisinske sopparter er å finne innen rekkene basidiomykota (stilkesporesopp) og ascomycota (sekkesporesopp), men finnes også innen zygomykota, (koblingssopp). Sopp hvor kjønnet stadium (enda) ikke er påvist blir betegnet som «imperfekte sopp».
Fylogenestisk inndeling går på tvers av denne morfologiske inndelingen, og moderne DNA teknikk har gitt en omfattende reorganisering av sopp basert på DNA. Identifikasjon basert på massespektrometri og sekvensering og bruk av oppdaterte bibliotek og databaser basert på ny taksonomi oppmuntrer til navneendringer som enda ikke gjenspeiles i klinikk og beskrivelse av sykdommer forårsaket av sopp. Eksempelvis er ulike Candidaarter reklassifisert og noen av slektene er omdøpt til *Pichia, Meierozyma*, *Kluyveromyces, Yarrowia* med flere. Seksuell og aseksuell form har dessuten ulike navn. Dette innebærer blant annet at begrepet candidemi egentlig ikke er dekkende for tilstanden, og at EUCAST brytningspunkttabeller for «andre» candidaarter blir misvisende. Dette sammen med en viss skepsis til omfattende navneendringer kan være medvirkende årsak til at nye navn enda ikke er fullstendig implementert i medisinsk mykologi.

Innledning der smittestoffet kort omtales

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 soppinfeksjoner med *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii, Histoplasma*, *Coccidioides*, *Paracoccidiodes, Blastomyces* og *Talaromyces marneffei* svært sjeldne.
Vi håndterer mange ulike smittestoffer innen kategorien medisinske soppsykdommer, også ulike dermatofyttarter som er årsak til overfladiske infeksjoner i hud, hår og negl.

Anvendt referansediagnostikk og analysemetoder

Vi søker å tilby oppdaterte diagnostiske metoder for påvisning av sykdomsfremkallende sopp, med *hovedfokus* diagnostikk av alvorlige invasive infeksjoner. Avhengig av problemstilling utfører vi primærdiagnostikk som ikke tilbys ved andre laboratorier (hovedsakelig infeksjonsimmunologisk- og DNA-basert diagnostikk). Vi har med aktuell bemanning ikke mulighet for å utføre vanlig rutine/standard soppdyrkning for andre laboratorier, men mottar klinisk viktige soppisolat til identifikasjon og resistensbestemmelse, dessuten sendes alle Candida isolater fra blod til oss for overvåknings formål (NORM).
I 2008 ble de fleste dyrkningsanalysene ved laboratoriet akkreditert. Laboratoriet deltar i ekstern kvalitetskontroll gjennom UK NEQAS, QCMD og INSTAND. Galaktomannan inngår i vårt SLP-programm, men er foreløpig ikke akkreditert analyse. Vi deltar dessuten i et nordisk-nederlandsk samarbeid for kvalitetskontroll av Pneumocystis immunfluorescens mikroskopi og har avtalt et svensk-norsk samarbeid om betaglukan, men foreløpig er heller ikke dette akkrediterte analyser.

Dyrkning med identifisering og resistensundersøkelse for ulike sopparter tilsendt fra andre laboratorier:

Gjærsoppdyrkning
Ved primær dyrkning av gjærsopp inkuberes **Sabouraud** dekstrose agar (**SAB**)(Difco) skåler og eventuelt **kromogent medium** (CHROMagar Candida (BD)) 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.

Muggsoppdyrkning
Primær dyrkning av muggsopp-prøver utføres på **SAB**-skåler som inkuberes ved 28 °C 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 SAB-skåler som inkuberes som over i 28 døgn.

Dermatofyttdyrkning
Ved dermatofyttdyrkning benyttes **SAB** skåler og **Mycobiotic agar m 0,04 % cycloheximid** (Mycosel agar (BBL)som inkuberes aerobt i 28-30˚C i 28 dager. Vi har ikke implementert resistensbestemmelse av dermatofytter og ved opplysninger om terapisvikt eller mistanke om resistens videresendes dermatofyttisolat til Statens Seruminstitutt i København for resistensbestemmelse med EUCAST metoden.

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 identifikasjon av filamentøse sopparter, enten ved direkte metode eller etter inkubering i flytende medium.
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.
    b. **Tapepreparat fra kulturer:** Ved identifikasjon filamentøse sopp er mikroskopi med **Laktofenolblått** (Lactophenol solution, Merck) viktig for riktig artsidentifikasjon, eventuelt benyttes tilsvarende farging av nålepreparat.
3. **Sekvensering av soppisolat** (ikke akkreditert metode)**.**
    a. **ITS2** sekvensering på kulturer benyttes ved vanskelig eller ikke entydig identifikasjon med andre metoder.
    b. **D1D2** sekvensering benyttes ved behov for bedret artsidentifikasjon.
    c. **Beta-tubulin** sekvensering benyttes blant annet for bedre diskriminering innad i Aspergillus-kompleksene.
4. **Biokjemiske metoder** brukes nå kun unntaksvis.

Alle systemiske soppisolater blir resistensbestemt.

1. Vi benytter **MIC-gradienttest** (ETEST® Biomérieux) og **RPMI medium med MOPS** (Sigma/DIFCO) til MIC bestemmelse av antimykotika. MIC gradienttest fra Liofilchem® benyttes for enkelte midler (isavukonazol og evt vorikonazol). Resistensbestemmelse av muggsopp er ikke akkreditert analyse.
2. Vi samarbeider med Statens Seruminstitutt i København for verifisering av ervervet resistens hos Candida, og videresender resistente isolat til **buljongfortynning** (EUCAST referansemetode med mikrobuljongfortynning) og for **genetisk påvisning av echinocandinresistens** (*fks* gen sekvensering).

Resistensbestemmelse av sopp er ikke en akkrediterte analyser på SSI, men deres sopp referanselaboratorium er EUCAST utviklingslaboratorium for soppresistens og assisterer både danske og internasjonale laboratorier.

3. **Påvisning av azolresistens hos *Aspergillus fumigatus***: In-house metode for genetisk påvisning av azolresistens ved hjelp av **sekvensering av CYP51 genet hos *Aspergillus* sp.** Vi påviser de vanligste mutasjonene ved azolresistens, TR_{34}/L98H og TR_{46}/Y121F/T289A, men kan også finne andre mutasjoner. (Ikke akkreditert analyse)
4. Fenotypisk påvisning av azolresistens hos *Aspergillus fumigatus* med brytningspunksagar (VIP CHECK™) ble implementert som screening metode i 2021.

Mikroskopi:

1. **Calcofluorwhite farging** (BD diagnostics)**:** Fargemetoden benyttes for påvisning av soppelementer 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-isothiocyanat (FITC) binder seg til alle former av *Pneumocystis jirovecii* (cyster, sporozoitter, trophozoitter og extracellulær matrix). Ikke akkreditert analyse.
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 og muggsoppdyrkning. Analysene er foreløpig ikke implementert i serum/plasma.
2. **Påvisning av Mucorales DNA:** In-house PCR 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 som tilbys alle hverdager. Aktuelt prøvemateriale BAL og indusert sputum, men analysen utføres også i ekspektorat og prøver fra øvre luftveier samt sterile materialer. Prøver fra nedre luftveier/BAL 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. Da mengden DNA er høyest i nedre luftveier kan påvisning av små mengder DNA i prøver fra øvre luftveier også indikere infeksjon, ved tvil om diagnose anbefales BAL.

4. **Påvisning av *Pneumocystis jirovecii* resistensgener*:*** Validering av metode gjennomført, men analysen er lite etterspurt og ikke implementert i rutinen, dette også med bakgrunn i at påvisning av resistens korrelerer dårlig med behandlingssvikt.
5. **Påvisning av sopp DNA direkte i prøvematerialet:** Der sopp *ikke* påvises ved spesifikke PCR analyser kan sopp DNA påvises direkte i 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. **Spesifikk** in-house **Trichophyton PCR** ble implementert som supplement til eksiterende PCR i januar 2022 og kan påvise *T. rubrum* og *T. mentagrophytes/interdigitale* DNA direkte i positive prøver.

Antistoffundersøkelse:

1. **Presipiterende antistoffer mot dimorfe sopparter**. (ID - Fungal antibody System, IMMY) Vi påviser presipiterende antistoff mot *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* og *Coccidioides immitis*.

Antigenpåvisning

Disse analysene utføres på vår Enhet for virologi og infeksjonsimmunologi (VIM)

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. Screeningtest i serum med tanke på 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. Analysen utføres 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 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 INCORPORATED). Pan-fungal test. De fleste sopparter (unntatt mucorales- og kryptokokkarter) har (1-3)-β-D-Glukan i celleveggen, og påvisning av betaglukan i serum kan indikere invasiv infeksjon med bla Candida, Aspergillus og Pneumocystis hos pasienter med svekket immunforsvar. Både falsk negative og falske positive tester forekommer. Betaglukan kan lett forurense prøven, og testens negative prediktive verdi anses som mest relevant klinisk. Metoden er ikke like etterspurt som forventet.
   Resultat angis i pg/ml og «PÅVIST»/ «IKKE PÅVIST».
   Produsenten angir teknisk cut-off for analysen: 70 pg/ml
   Positiv: ≥80pg/ml
   Negativ: <60pg/ml
   Gråsone: 60-79pg/ml
   Egne gråsoneverdiser utarbeidet i 2022 og publisert i brukerhåndbok.

Serumkonsentrasjonsmålinger av antimykotika

1. Vorikonazol og posakonazol serumkonsentrasjonsmålinger utføres *ikke* på Referanselaboratoriet, men på Avdeling for farmakologi, OUS-Rikshospitalet. Se www.anx.no
2. Konsentrasjonsmåling av Isavukonazol må i dag sendes til SSI, København. Avdeling for farmakologi er forespurt om å implementere denne analysen.
3. Flucytocin serumkonsentrasjonsmåling gjøres på SSI, København eller Karolinska Universitetssjukhuset, Stockholm.

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

Referanselaboratoriet bistår andre laboratorier med diagnostikk ved mistanke om særskilte infeksjoner som endemiske mykoser, men referanselaboratoriet har til nå *ikke* vært benyttet i sammenheng med beredskap eller utbrudd.
På Rikshospitalet var en uvanlig opphopning av alvorlige mucoralesinfeksjoner på sensommeren 2022, med to ulike agens og fire ulike avdelinger involvert. Dette ble meldt til Vesuv, men vi klarte ikke sammen med smittevern og OUS drift å finne noen felles kilde for infeksjon og opphopningen av infeksjoner opphørte uten tiltak.
I løpet av 2022 har det vært uvanlig fokus på soppinfeksjoner i media blant annet i forbindelse med at WHO definerte første «Fungal priority pathogens list».

Table 3. WHO fungal priority pathogens list

Critical group	High group	Medium group
Cryptococcus neoformans	*Nakaseomyces glabrata (Candida glabrata)*	*Scedosporium spp.*
Candida auris	*Histoplasma spp.*	*Lomentospora prolificans*
Aspergillus fumigatus	Eumycetoma causative agents	*Coccidioides spp.*
Candida albicans	Mucorales	*Pichia kudriavzevii (Candida krusei)*
	Fusarium spp.	*Cryptococcus gattii*
	Candida tropicalis	*Talaromyces marneffei*
	Candida parapsilosis	*Pneumocystis jirovecii*
		Paracoccidioides spp.

Infeksjon eller bærerskap med *C. auris* er gjort meldepliktig til MSIS med bakgrunn i denne soppens resistensegenskaper og spredningspotensial i sykehus. Mange norske laboratorier startet screening av utsatte pasientgrupper etter publikasjonen Rapid risk assessment: Candida auris outbreak in healthcare facilities in northern Italy, 2019-2021 (europa.eu). Soppinfeksjoner for øvrig er ikke rapporteringspliktige til MSIS med mindre de inngår som AIDS-definerende infeksjon (kryptokokk- eller *Pneumocystis jirovecii* infeksjon).

Det finnes ingen god epidemiologisk oversikt over ulike alvorlige soppinfeksjoner i Norge. Opptelling av dyrkningspositive prøver gir ingen fullstendig oversikt over epidemiologien ved soppinfeksjoner da sopp er en del av endogen flora, kan kolonisere øvre luftveier uten å gi sykdom og soppsporer er svært utbredt. Oppvekst eller påvisning av antigen eller DNA er derfor ikke alene diagnostisk for sikker påvisning av infeksjon. Studier er helt avgjørende for å få bedre kjennskap til epidemiologiske forhold, men det har vært vanskelig å få finansiering. Det ble publisert et estimat over forekomsten av soppinfeksjoner i Norge i 2018, men bare gode prospektive studier kan gi oss bedre oversikt over infeksjonenes omfang.

Alle gjærsoppisolater fra blodkultur fra alle norske mikrobiologiske laboratorier sendes til Det nasjonale referanselaboratoriet for medisinske soppsykdommer for endelig identifikasjon og resistensbestemmelse. Referanselaboratoriet rapporterer forekomst av Candida i blodkultur til NORM, og artsdistribusjon og resistensdata publiseres årlig, i

NORM NORM-VET 2021 (pdf). Med støtte i disse data er det publisert flere artikler med epidemiologiske candidemidata i Norge fra perioden 1991-2015.

Soppisolat fra blodkultur:
I 2022 mottok Referanselaboratoriet totalt 261 ulike soppisolat fra positive blodkulturer. Candidaartene dominerer fortsatt (n= 245), hvorav 137 (55,6 %) er *C. albicans*, mens syv isolat (2,7%) var fra non-candida fungemier, bl.a. to *Cryptococcus neoformans*, to *Rhodotorula mucilaginosa*, to *Saccharomyces cerevisiae* og en *Trichosporon asahii* dessuten to *Mucor circinelloides.*
Endelig oversikt over Candida artsdistribusjon og resistens fra blodkultur publiseres i NORM-rapporten for 2022.

Gjærsopp:
Vi er ikke kjent med at det har forekommet utbrudd med *C.auris* i norske sykehus i 2022. Vi mottok tre *C. auris* isolat fra andre laboratorier i 2022, men påviste ikke selv *C. auris* bæreskap ved screening på OUS i 2022.
Vi mottok forøvrig 300 ulike gjærsoppisolat hvorav 282 ulike candidaarter fra et bredt spekter av andre materialtyper enn blod. *C.albicans* (n=186) er fortsatt vanligst. Dette dreier seg både om isolat fra materialer hvor candida og annen gjærsopp inngår som en del av normalfloraen, og fra invasive prøver som biopsier og spinalvæske.
I 2022 mottok vi syv *Cryptococcus neoformans* isolat fra fire pasienter, alle med annen immunsvikt enn hiv. En pasient hadde oppvekst både i spinalvæske og blod, en pasient i spinalvæske alene, to pasienter med oppvekst fra ledd/ben hvor den ene pasienten også hadde oppvekst i blodkultur.

Dermatofytter:
Påvisning av Dermatofytt DNA har i økende grad erstattet dyrkning ved diagnostikk av dermatofyttinfeksjoner, og utføres nå av mange laboratorier i Norge. Dyrkning anbefales fortsatt ved uventet negativ PCR eller ved terapisvikt og mistanke om resistens. Det er de siste årene rapportert om en økende forekomst av dermatofyttinfeksjoner med spesielt virulente og terbinafinresistente stammer som *Trichophyton indotinae* en art identisk med genotype VIII i *T. mentagrophytes/T. interdigitale* species komplekset, en art med uvanlig spredningspotensial og hvor hele familier smittes og sliter med effektiv eradikering. Korrekt artsidentifikasjon av *Trichophyton indotinae* er vanskelig uten spesifikk PCR eller sekvensering.
Ønsket om å bevare kompetansen på dermatofytter og dermatofyttinfeksjoner i laboratoriet har på denne måten fått økt aktualitet, men vi har dessverre ikke kapasitet til å utføre primær dermatofyttdyrkninger for andre laboratorier uten slike spesifikke problemstillinger. Dyrkning bør som hovedregel fortsatt utføres lokalt eller regionalt slik det ble konkludert i strategirapporten i 2013. Referanselaboratoriet er behjelpelig med identifikasjon ved behov. Ved klinisk mistanke om terbinafinresistens eller behandlingssvikt må vi foreløpig videresende isolatet til resistensbestemmelse ved referanselaboratoriet for mykologi på Statens Seruminstitutt, men vi planlegger å

innføre spesifikk påvisning av aktuelle resistensgener hos oss.

Muggsopp:
På tross av internasjonale rapporter om økende forekomst av muggsopp hos intensivpasienter, ikke bare i samband med korona, er antallet *tilsendte* muggsoppisolat fortsatt lavt (n=133). Vi ønsker å få tilsendt *alle* invasive isolat, muggsoppisolat fra potensielt systemiske infeksjoner og isolat fra pasienter hvor kliniker planlegger behandling med antimykotika.
I 2022 mottok vi 85 ulike Aspergillusisolat fra 70 pasienter, hvorav 53 *A. fumigatus,* dessuten 7 ulike mucorales-isolat og 18 andre muggsoppisolat med antatt klinisk betydning som ulike *Fusarium*, *Scopularopsis* og *Scedosporum* arter, i tillegg til 18 antatt kontaminanter som *Penicillum*.
Det er viktig å merke seg at muggsoppisolat fra pasienter innlagt på OUS Rikshospitalet *ikke* inngår i denne oversikten da disse prøvene håndteres i vår ordinære rutine og må telles separat.
Muggsoppinfeksjoner er alvorlige infeksjoner hvor riktig artsidentifikasjon vanligvis kan rettlede optimal behandling. Internasjonalt er det bekymring knyttet til økende forekomst av azolresistens hos *Aspergillus fumigatus,* men slik resistens synes fortsatt sjelden i Norge, foreløpige tall indikerer ca 1 % resistente stammer. Ervervet azolresistens kan sees under langvarig azolterapi, men azolresistens påvises også hos pasienter som ikke har fått slik behandling. I 2022 sekvenserte vi to *A.fumigatus* isolat mtp påvisning av resistensmutasjoner. Bare en azolresistent stamme fra en CF pasient var tilsendt fra annet laboratorium. Vi påviste ingen stammer med kjente resistensmutasjoner i 2022 (n=2), heller ikke stammer med genvariantene TR_{34}/L98H eller TR_{46}/Y121F/T289A som er assosiert med bruk av azoler i miljø (bl.a. plantevernmidler).

Pneumocystis
Vi anser påvisning av DNA som primær analyse ved spørsmål om pneumocystis-infeksjon, men har rutinemessig søkt å verifisere prøver med lave ct-verdier med mikroskopi. Påvisning av cyster ved mikroskopi er diagnostisk for PCP, men underestimerer reell forekomst av infeksjon hos pasienter som ikke er HIV positive. Forekomsten av cyster er lav hos hematologiske pasienter og pasienter fra andre risikogrupper enn pasienter med AIDS. Vi avsluttet rutinemessig IF mikroskopi av prøver med estimert moderat mengde Pneumocystis DNA i desember 2022 da vi ikke har funnet cyster i prøver med ct verdier mellom 22 og 28 mikroskopert hos oss de siste tre år.
På tross av at mange laboratorier nå utfører analysen er analysevolumet økende til 1460 DNA analyser og 162 utførte mikroskopier.

Andre molekylære soppanalyser og galaktomannan;
For de molekylære soppanalysene var det en stor økning i prøver til påvisning av *Aspergillus* sp DNA og *A.fumigatus* DNA, fra 1447 i 2019 til 2261 i 2021. Tilsvarende

antall av prøver til galaktomannan i 2019-21 var 3720 til 4587. Prøvevolumet er igjen normalisert med hhv 2313 prøver til Aspergillus DNA og 3540 galaktomannan. Påvisning av galaktomannan (Aspergillus antigen), *Aspergillus fumigatus* DNA og *Aspergillus sp* DNA benyttes som screeninganalyser hos høyrisikopasienter, men også som støtte i diagnostikk av aspergillusinfeksjoner, både som «markører» for sykdom *eller* fravær av sykdom, avhengig av klinisk problemstilling, klinikk og andre parametere.
Antallet prøver til påvisning av sopp DNA direkte i prøvematerialet ved hjelp av ITS2 og D1D2 PCR og sekvensering er redusert, da analysen nå delvis erstattes av raskere, mer sensitive og mindre arbeidskrevende spesifikke PCR-metoder.

Antall isolat mottatt eller analyser utført	2019	2020	2021	2022
Gjærsoppisolat fra blod til identifisering og resistensbestemmelse	252	245	239	279
Gjærsoppisolat fra andre lokalisasjoner	195	161	180	303
Tilsendte muggsoppisolat	96	85	98	133
Dermatofytt dyrkning	40	91	77	88
Langtidsdyrkning sopp	45	15	34	47
Calcofluorwhite mikroskopi	147	126	216	159
Pneumocystis IF	169	72*	147	162
Pneumocystis jirovecii DNA	1305	1160	1330	1460
Dermatofytt DNA	900	813	881	797
Aspergillus sp DNA	1447	1557	2261	2313
A.fumigatus DNA	1447	1554	2261	2309
Mucorales DNA	247	213	687	434
Direkte påvisning av sopp DNA (ITS2+D1D2 rDNA med sekvensering)	448	298	207	265
Antistoff mot dimorfe sopparter (prøver)	34	24	20	36
Galaktomannan	3720	3326	4587	3540
Kryptokokkantigen	112	87	84	174
Beta-glukan	161	145	208	363

Funn og epidemiologiske data med aktuelle trender (over år) i tabellform

Se NORM NORM-VET 2021 (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 kunnskap om diagnostikk ved soppinfeksjoner til klinikere både i og utenfor OUS. Referanselaboratoriet får henvendelser fra andre laboratorier, kollegaer og andre som

søker råd om diagnostikk og behandling av soppinfeksjoner, eller problemer knyttet til medisinsk mykologi. I 2022 har vi i samarbeid med infeksjonsmedisinere på Rikshospitalet kontinuert tverrfaglige møter med kollegaer i Helse Bergen om utredning og behandling av pasienter med alvorlige soppinfeksjoner med oppkobling via norsk helsenett.
Vi mottar dessuten hospitanter fra andre laboratorier som ledd i kompetanseoppbygging av bioingeniører og leger i spesialisering. Representanter fra referanselaboratoriet holder også foredrag og underviser studenter. Det obligatoriske LIS kurset i medisinsk mykologi gjennomføres nå hvert annet år, neste gang i mai 2022. Resistensbestemmelse av sopp ble gjeninnført som tema på AFA-kurset i 2017, sist i mars 2022.
Vi samarbeider med andre laboratorier blant annet vedrørende kontrollstammer for dermatofytt PCR, etablering av pneumocystis PCR, galaktomannan og Aspergillus 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 lenke fra domenet www.mykologi.no. Siden vil videreutvikles for å nå rekvirentene med nyttig informasjon om virksomheten ved referanselaboratoriet, men alle analysene våre er beskrevet i avdelingens elektronisk brukerhåndbok, se Brukerhåndbok i medisinsk mikrobiologi OUS (labfag.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. Alle resultater av identifisering og resistensbestemmelse rapporteres tilbake til rekvirerende laboratorium.
Referanselaboratoriet samarbeider med ulike forskningsgrupper i og utenfor OUS, som avdelingens forskningsgruppe «Fungal and bacterial research group» (FBI) ledet av Førsteamanuensis Jørgen Vildershøj Bjørnholt, det nasjonale nettverket av mikrobiologer, infeksjonsmedisinere og pediatere i Norwegian Fungal Network og The European Pediatric Mycology Network (EPMyN) bestående av barneleger og mykologer fra ulike europeiske institusjoner.
Fra 2017-2019 deltok vi i et nettverksprosjekt «Tverrfaglig tenketank for å minimere fremvekst og spredning av antifungal resistens» (ResAzoleNet) finansiert av Forskningsrådet. Vi har fortsatt 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 og vårt felles prosjekt «Navigating the threat of azole resistance development in human, plant and animal pathogens in Norway» (Navazole) ble tildelt midler fra forskningsrådet i desember 2020. Stipendiat Marie Therese Noer med førsteamanuensis Jørgen V. Bjørnholt som hovedveileder er nå godt i gang med innsamling av *Aspergillus fumigatus* stammer.

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

Referansefunksjonen mottar ikke særskilt finansiering fra eget HF/RHF.
Cecilie Torp Andersen er fagansvarlig overlege for referanselaboratoriet og styremedlem og sekretær i Nordic Society for Medical Mycology (NSMM). Førsteamanuensis Jørgen Vildershøj Bjørnholt er forskningsansvarlig overlege og norsk representant i EUCASTs Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST). Aina Myhre er fagansvarlig spesialbioingeniør, og er hovedansvarlig for den daglige driften på selve referanselaboratoriet.
Driften av referansefunksjonen har vært utfordrende også i 2022 både grunnet sykefravær på enheten som utfører antigenanalyser og kjensgjerningen at referansefunksjonen ivaretas av små enheter med få medarbeidere med mange ulike oppgaver som krever spesiell kompetanse.
En stadig større andel av referansefunksjonens analyser er knyttet til molekylær mikrobiologi og antigentester, hvor daglig drift ligger under enhetene for hhv bakteriologi og for virologi og infeksjonsimmunologi på Rikshospitalet. Dette er fortsatt manuelle arbeidskrevende analyser.
Leger og bioingeniører tilknyttet referansefunksjonen utfører oppgavene i tillegg til andre oppgaver ved Avdeling for mikrobiologi, og manglende finansiering gjør at vi bruker lang tid på å implementere ny og nødvendig diagnostikk da virksomheten til denne referansefunksjonen konkurrerer med svært mange andre funksjoner og oppgaver avdelingen er pålagt. Tilsvarende referansefunksjoner i våre naboland ivaretas med større personellresurser.
Ressurstilgang *er* en gjentagende problemstilling. Referanselaboratoriet er nå i gang med å implementere en PCR-metode for påvisning av *Candida* DNA direkte på prøvemateriale. Vi ønsker fortsatt å implementere EUCAST buljongfortynning som referansemetode ved resistensbestemmelse av gjærsopp, og startet planlegging i 2021, men nye pålegg om CE merking og utfordringer knyttet til IVDR forordningen samt pandemihåndtering satte en stopper for denne prioriterte oppgaven som nå søkes videreført i 2023. Vi ønsker også å innføre genetisk påvisning av echinocandinresistens hos Candida (*fks* gen sekvensering). Nye utfordringer med IVDR og våre in-house soppanalyser forventes å kunne påvirke implementering av nye analyser, og endring av epidemiologi som for dermatofyttinfeksjoner med terbinafinresistente virulente arter tvinger fram endringer i diagnostikk som ikke var planlagt.
Det er internasjonalt økende bekymring for azolresistent *A. fumigatus* og det er ønskelig med en bedre overvåkning av forekomst av slik resistens i Norge. Foreløpig påviser vi kun et par azolresistente *A.fumigatus* stammer pr år, men andelen undersøkte isolat er fortsatt svært lav og tilsendte isolat er få. Det er svært bekymringsfullt dersom kritisk syke, immunsvekkede pasienter får infeksjon med resistente stammer da de er avhengig av azoler for optimal behandling og vi vet at resistens finnes også hos oss, men vet ikke om dette kun er assosiert med import eller om vi har naturlige habitat som påvirker slik

resistensutvikling i Norge. Vi håper vårt nye forskningsprosjekt (NavAzole) vil bedre oppfølging av denne problemstillingen.
Som referanselaboratorium ønsker vi å tilby nødvendig diagnostikk og ha ressurser til adekvat håndtering av problemer knyttet til mykologi og resistens, men med dagens manglende finansiering er dette vanskelig. Vi *har* klart å opprettholde våre kjerneoppgaver og klarte blant annet å oppskalere screening for invasiv aspergillose og mukormykose under pandemien, men videreutvikling av ønskede og nye metoder tar lang tid. Vi har god kontakt med kollegaer på andre sykehus, men ser et økende behov for å bredde denne kontakten og å kunne gjennomføre flere tverrfaglige kasusmøter for optimal behandling av pasienter også utenfor OUS.

Publikasjoner

Ingen i 2022.

Oslo 31.03.2023

Aina Myhre
Fagansvarlig spesialbioingeniør

Cecilie Torp Andersen
Overlege

Jørgen Vildershøj Bjørnholt
Overlege, Førsteamanuensis

Fredrik Müller
Avdelingsleder, Professor