

Systemiske soppinfeksjoner -
en utfordring i fremmarsj
Molekylær identifikasjon og resistensbestemmelse



Studentoppgave av
Stud.med.
Erik Koldberg Amundsen

Invasive fungal infections-a rising challenge

Molecular identification and susceptibility testing

Abstract

Fungi, both yeast and moulds are emerging, as important pathogens in immunocompromised patients. Symptoms and signs of invasive fungal infection may be unspecific, and clinical diagnosis is difficult- hence early fungal identification is important for improving outcome.

OBJECTIVE: This thesis aims to identify isolates from invasive fungal infection and provide a basis for molecular diagnostics by sequencing ribosomal DNA (rDNA) in clinical isolates. Furthermore the E-test, a novel susceptibility test for yeast was evaluated.

METHODS: PCR amplification and sequencing of 18S rDNA were used to analyse clinical samples of yeasts and filamentous fungi from invasive infections in patients at Rikshospitalet. The results were compared to conventional identification. In addition the samples were subjected to susceptibility testing to fluconazole and voriconazole using disc diffusion test and the recently released E-test.

RESULTS: Molecular identification showed higher sensitivity than conventional diagnostics. VITEK-2 and CHROMagar performed better than API 20 C AUX. Isolates resistant to fluconazole were sensitive to voriconazole. The results obtained with the E-test were comparable to those obtained by disc diffusion.

DISCUSSION: Molecular fungal identification is a promising approach for sensitive and early diagnosis of invasive fungal infection. Time from sampling to identification can be reduced to eight hours and the sensitivity improved. With the emergence of fluconazole resistant fungal pathogens the advent of voriconazole is a welcome one. The E-test can be reliably used to determine susceptibility to antifungal drugs.

* Bildet på forsiden viser *Aspergillus fumigatus* og er hentet fra Chiba University Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Copyright 1999 (<http://www.pf.chiba-u.ac.jp/english/egallery-index.htm#A>).

1 Innledning	4
1.1 Sopp som årsak til sykdom.....	4
1.2 Klassifikasjon av sopp.....	4
1.3 Påvisning og identifikasjon av sopp.....	5
1.4 Behandling og resistensbestemmelse av sopp.....	6
1.5 Målsetning.....	7
2 Materiale og metoder	7
2.1 Soppisolater.....	7
2.1.1 Kliniske soppisolater.....	7
2.1.2 Referansestammer.....	9
2.1.3 Prøver fra Veterinærinstituttet.....	9
2.2 Dyrkningsmedier.....	9
2.3 Konvensjonelle diagnostiske tester.....	10
2.3.1 CHROMagar.....	10
2.3.2 API 20 C AUX.....	10
2.3.3 VITEK 2.....	10
2.4 Molekylære diagnostiske metoder.....	11
2.4.1 Isolering av DNA.....	11
2.4.2 PCR.....	11
2.4.3 Gel elektroforese.....	13
2.4.4 Rensing av PCR produkt.....	13
2.4.5 DNA sekvensering.....	13
2.5 Resistensbestemmelse.....	14
3 Resultater	14
3.1 Identifikasjon av soppisolater ved bruk av konvensjonelle metoder.....	14
3.1.1 CHROMagar.....	15
3.1.2 API 20 C AUX.....	15
3.1.3 VITEK 2.....	15
3.2 Molekylær identifikasjon ved ribosomal PCR-sekvensering.....	15
3.2.1 18S rDNA PCR sekvensering med 1400-1403 primere.....	15
3.2.2 18S rDNA PCR sekvensering med TR3-TR4 primere.....	15
3.2.3 26S rDNA PCR sekvensering med NL1-NL4 primere.....	16
3.3 Resistensbestemmelse av gjærsopp mot voriconazole og fluconazole.....	19
4 Diskusjon.....	20
4.1 Generell diskusjon.....	20
4.2 Diskusjon av metodologi.....	20
4.2.1 Konvensjonell identifikasjon.....	20
4.2.2 Molekylær identifikasjon.....	21
4.3 Resistensbestemmelse.....	22
4.4 Fremtidsperspektiver.....	22
5 Konklusjon.....	22
6 Referanser	22

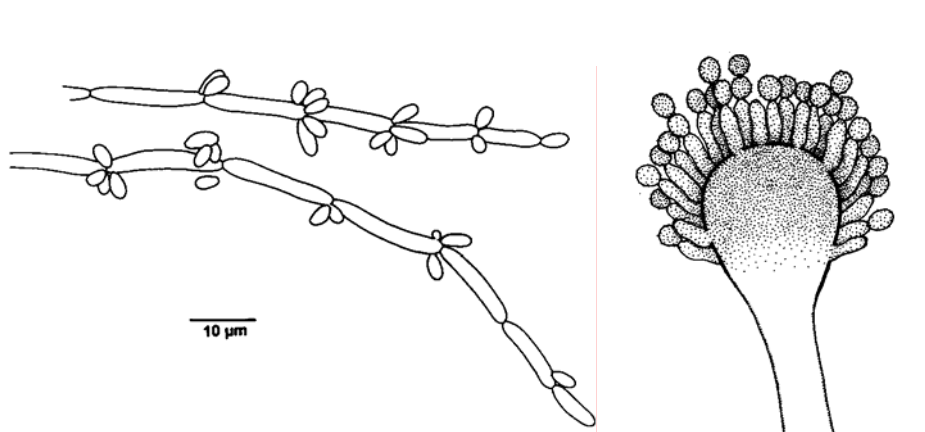
1 Innledning

1.1 Sopp som årsak til sykdom

Et svært begrenset antall sopparter gir infeksjon (mykose) hos mennesker med normalt kompetent immunforsvar. Mykosene kan inndeles i overfladiske mykoser (hud, hår negler), subkutane mykoser (underhud, fascie, muskel) og dype mykoser som rammer kroppens indre organer. Blant dype mykoser kan man igjen skille mellom infeksjoner med primærpatogene og opportunistiske sopparter. En annen form for inndeling er i nosokomiale og ikke nosokomiale infeksjoner. I Norge er det store flertallet av dype mykoser nosokomiale infeksjoner av immunkompromiterte pasienter, men ettersom det blir vanligere å behandle immunkompromiterte pasienter utenfor sykehus vil også flere slike infeksjoner forekomme der. Sopp utgjør en vesentlig del av kroppens normalflora og dette er oftest reservoaret for gjærsoppinfeksjoner. Koloniseringen av tarmslimhinnen antas å være spesielt viktig. For pasienter med dårlig immunforsvar som i tillegg har andre risikofaktorer som ernæringssvikt eller som behandles med bredspektret antibiotika kan sopp få tilgang til blodbanen fra tarmen og derfra diseminere til kroppsvæv. Muggsopp kan spres som sporer i luften og gir ofte opphav til infeksjon av luftveiene. Det store flertallet av nosokomiale soppinfeksjoner forårsakes av *Candida spp.* I en studie av forekomsten i USA mellom 1980 og 1990 utgjorde *C. albicans* 61% av alle nosokomiale infeksjoner, *C. glabrata* var nest hyppigst med 8% og deretter fulgte *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* og *C. Krusei*. *Aspergillus spp.* står for en mindre andel men har ofte et fulminant forløp¹⁹. De siste tiårenes medisinske fremskritt har gjort at det finnes stadig flere pasienter med nedsatt immunforsvar. Pasienter kan holdes i live ved tilstander man tidligere ikke har kunnet behandle, immunsupresjon gis til organtransplanterte pasienter og cytostatika til kreftpasienter. I tillegg har AIDS gitt en ny populasjon med pasienter med svekket immunforsvar.

1.2 Klassifikasjon av sopp

Sopp er eukaryote mikrober som finnes i stort antall spredt i hele naturen. Taksonomisk grupperes sopp på bakgrunn av reproduksjonsmåte inn i seks divisjoner som videre deles opp klasse, orden, familie, slekt og art (Tabell 1). Tradisjonelt er det vanlig å dele inn sopp etter vekstmønster. Gjærsopp opptrer som runde ovale celler og formerer seg ved askesuell knoppsskyting. De filamentøse soppene omfatter muggsopp og dermatofytter. Disse danner tubulære, filamentøse strukturer som kalles hyfer som tjener både til næringsopptak og reproduksjon (Figur 1).



Figur 1 Pseudohyfer hos gjærsopp (*C. norvegensis*) og conidia hos muggsopp (*A. fumigatus*) (Hentet fra ”Atlas of clinical fungi”, de Hoog, G.S., Guarro, J.)

Tabell 1. Klassifikasjon av sopp. Kun klinisk relevante arter gjengitt. Kun anamorfe navn. (Adaptert fra ”Atlas of clinical fungi” de Hoog, G.S og Guarro, J 1995)

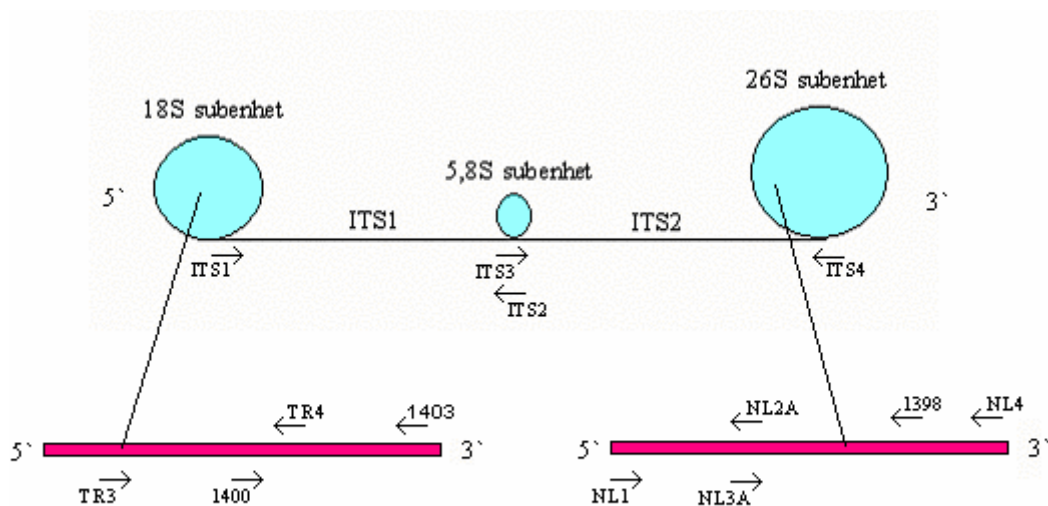
Divisjon	Klasse	Orden	Familie	Slekt	Art	
Myxomycota						
Chytridiomycota						
Oomycota						
Zygomycota		Mucorales	Mucoraceae	<i>Absida</i>	<i>corymbifera</i>	
Ascomycota	Endomycetes		Saccaromycetaceae	<i>Candida</i>	<i>krusei</i>	
			Endomycetaceae	<i>Candida</i>	<i>famata</i>	
				<i>Candida</i>	<i>guilliermondi</i>	
				<i>Candida</i>	<i>norvegnesis</i>	
				<i>Candida</i>	<i>lusitaniae</i>	
	Euascomycetes	Onygenales	Dipodascaceae	<i>Candida</i>	<i>kefyr</i>	
			Lipomycetaceae	<i>Trichophyton</i>	<i>rubrum</i>	
			Eurotiales	Arthrodermataceae	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigatus</i>
				Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
					<i>Penicillium</i>	<i>comune</i>
Basidiomycota	Heterobasidomycetes	Microascales	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>	<i>brevicaulis</i>	
		Filobasidiales		<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>	

1.3 Påvisning og identifikasjon av sopp

Symptomer og tegn ved invasiv soppinfeksjon er uspesifikke noe som gjør klinisk diagnose vanskelig. Ulike sopparter har ulik følsomhet for forskjellige antimykotika¹ og tidlig innsetting av antimykotisk terapi kan påvirke forløpet positivt. Hurtig og god diagnostikk er derfor av stor betydning for behandling. Gode laboratoriemetoder som raskt og sikkert kan identifisere sopp i klinisk materiale er viktig. Tradisjonelt har gjærsopp blitt påvist og identifisert ved hjelp dyrkning, morfologi og biokjemiske tester. Muggsopp identifiseres basert på vekst og mikroskopisk morfologi. I tillegg drar man nytte av at den vanligste

patogene arten *Aspergillus fumigatus*, i motsetning til de fleste andre klinisk relevante arter av likt utseende, er levedyktig ved inkubasjon på 48 °C. Konvensjonell soppdiagnostikk har de ulempene at den er tidkrevende, kan ha dårlig sensitivitet og ikke gir god nok identifikasjon av de ulike soppartene².

Det er publisert en rekke artikler med forskjellige PCR baserte assays som gir god sensitivitet og spesifisitet for identifikasjon av *Candida* spp^{3,4,5,6}. I disse arbeidene amplifiseres regioner av ribosomalt DNA. Genene for forskjellige ribosomale subenheter kan bli brukt som mål for DNA amplifisering (se figur 2). For dype *Aspergillus*-mykoser er det utviklet serologiske metoder basert på deteksjon av Galactomannan antigener⁷. Denne metoden blir nå hyppigere tatt i bruk og ble i 2002 inkludert i diagnosekriteriene utarbeidet av den europeiske konsensuskomiteen for definisjon av invasive soppinfeksjoner⁸. Det også publisert studier om molekylære metoder til amplifikasjon og deteksjon av ribosomalt DNA i klinisk prøvemateriale. De fleste av disse bruker ribosomalt DNA som PCR-target⁹. Behovet for molekylær basert hurtigdiagnostikk av sopp er stort.



Figur 2. Ribosomalt DNA kart med primere for sopp.

1.4 Behandling og resistensbestemmelse av sopp

Ergosterol er den viktigste sterolen i soppens yttermembran. Siden ergosterol ikke finnes i menneskelige celler er dette et godt egnet target for antimykotiske midler. For tyve år siden var Amphotericin B så godt som enerådende i behandlingen av invasiv soppinfeksjon. Amphotericin B tilhører gruppen polyener som binder ergosterol i soppens membran, dette fører til osmotiske lekkasje av intracellulære ioner og celledød. I de siste årene har det kommet nye antimykotiske medikamenter på markedet. Blandt azolene har fluconazole blitt standardbehandling for invasive *Candida*-infeksjoner. Senere har intrakonazole (ikke registrert for invasive soppinfeksjoner i Norge) og nylig voriconazole kommet på markedet og er gode alternativer ved infeksjon med fluconazole resistente arter. Azolene virker ved å hemme et enzym i ergosterol syntesen (C-14 demethylase). Nylig er også echinocandinene caspofungin registrert for behandling av invasive soppinfeksjoner i Norge. Echinocandinene

hemmer oppbygningen av β -1,3 glucan som er en viktig bestandel i celleveggen. Ettersom preparatene er nye er også testene som måler isolaters følsomhet og resistens nye.

1.5 Målsetning

Denne studien fokuserer på diagnostikk av invasive soppinfeksjoner. Målsetningen var følgende:

- Sammeligne nye molekylære metoder med konvensjonelle metoder for soppdiagnostikk
- Legge grunnlag for ny molekylær diagnostikk ved hjelp av 18S rDNA-basert sekvensanalyse
- Vurdere metoder for resistensbestemmelse for fluconazole og voriconazole

Hovedvekten av studien gikk ut på å legge grunnlaget for ny molekylær soppdiagnostikk ved å sekvensere 18S ribosomalt DNA fra klinisk relevante gjærsoppisolater i norsk sammenheng. Konvensjonelle metoder for soppdiagnostikk ble gjennomgått, prøvd ut og sammenlignet innbyrdes og med PCR diagnostikk slik at behov og muligheter for nye metoder for diagnostikk kunne kartlegges. De identifiserte kliniske isolatene ble resistenstestet med to ulike metoder. Disk diffusjonstesten er en etablert test, mens E-testen er av nyere dato. Det er utviklet standarder for resistenstesting både i USA (NCCLS)¹⁰ og i Europa (AFST-EUCAST)¹¹.

2 Materiale og metoder

2.1 Soppisolater

2.1.1 Kliniske soppisolater

Tabell 2. Kliniske soppisolater fra mikrobiologisk institutt, Rikshospitalet

Prøvenummer	Tentativ Art	Kilde		
		Diagnose/ rekvirent	Fødsår. Pas.	Prøvetype
1086	<i>C.krusei</i>	Nyre-, pancreastransplantasjon	1951	Ascites
2663	<i>C.albicans</i>	Leukemi	1985	Blodkultur
3557	<i>C.albicans</i>	Hematom	1912	Blodkultur
3774	<i>C.krusei</i>	Malignt lymfom Cytostatikabehandling	1942	BAL
5641	<i>C.glabrata</i>	Pancreatitt Ascites	1930	Blodkultur
8359	<i>A.fumigatus</i>	KML Benmargstransplantasjon Pseudomembbranøs Colitt Sepsis	1955	Tracheasekret
10630	<i>A.fumigatus</i>	Burkitts Lymfom	1964	BAL
11309	<i>C.parapsilosis</i>	Pat. Akutt. EBV infeksjon	1978	Autopsi Milt
11833	<i>A.fumigatus</i>	Pat. Lungefortetning	1961	Autopsi spinal væske
16081	<i>A.fumigatus</i>	ARDS	1940	BAL

16437	<i>C.albicans</i>	Bilateral lungetransplanasjon Immunsupprimert.	1952	Blodkultur
16781	<i>A.fumigatus</i>	Kronisk granulomatøs sykdom	1981	BAL
17414	<i>A.fumigatus</i>	Multitorgan svikt. Sannsynlig Soppinfeksjon lunger, nyre, milt, tarm	1954	Lunge autopsi
17953	<i>A.corymbifera</i>	Infeksjon finger	1955	Sårsekret
19343	<i>C.albicans</i>	Tett nyre stent	1936	Blodkultur
20664	<i>A.niger</i>	Lungetransplantasjon	1943	BAL
21992	<i>A.fumigatus</i>	Infisert shunt	1983	Spinalvæske
22234	<i>C.albicans</i>	Prematur Opr. Ductus.	2001	Blodkultur
22338	<i>A.terreus</i>	Lungetransplantasjon	1940	BAL
23172I	<i>C.albicans</i>	Prematur	2001	CVK-spiss
23172II	<i>C.parapsilosis</i>	Prematur	2001	CVK-spiss
24362	<i>scop</i>	Ortopedisk avdeling	1955	Annet mat.
24389	<i>C.glabrata</i>	Ca. mamma m/met	1947	Blodkultur
24684I	<i>Candida spp.</i>	ACB+AVR operasjon. Sårinfeksjon	1935	Trachealsekret
24684II	<i>C.albicans</i>			
24698	<i>C.albicans</i>	Leverreseksjon, gallelekkasje.	1921	Ascites
24821	<i>C.albicans</i>	Cerebralt empyem, Opr.	1990	Nesekret
24963	<i>C.albicans</i>	Mediastinititt, Opr. AVR	1935	Skyllvæske (venstre lunge)
24980	<i>C.inconspicua</i>	Nyre-, pancreastransplantasjon	1963	Drensvæske
25015	<i>C.albicans</i>	Emfysem Bilateral lungetransplanasjon	1944	BAL
25186	<i>C.albicans</i>	Prematur 24 uker	2001	Trachealtube-spiss
25760	<i>Candida spp.</i>	Leverabscess	1955	Drensvæske
25984	<i>A.fumigatus</i>	Hvitt belegg munn	1998	Munnsekret
26391	<i>C.albicans</i>	Div. bukkirurgi, respirator	1944	Sårsekret, buk
26746	<i>C.glabrata</i>	Levertrans. Immunkomp.	1949	Blodkultur
30064	<i>C.glabrata</i>	Mulig mykotisk aorta-aneurysme	1942	Autopsi aortavegg
33301	<i>A.fumigatus</i>	Nyretransplantasjon Laparotomi Nekrotisk pancreatitt	1931	Sekret fra Tracheostomi
34306	<i>A.niger</i>	Uklar sykdom, sepsis?	1929	Autopsi lever
34504	<i>C.albicans</i>	Nekrotisk faceitt	1945	Blodkultur
34888	<i>A.fumigatus</i>	Wegeners granulomatose Benmargstransplantasjon	1961	BAL
35228	<i>C.glabrata</i>	Empyem, abdominalt abscess	1932	Blodkultur
35479	<i>C.albicans</i>	Nyfødt	2000	Blodkultur
35526	<i>C.albicans</i>	Temperatur stigning. Urologisk kir avd.	1948	Blodkultur
40928	<i>A.fumigatus</i>	Hypogamma- globulinemi	1966	BAL
42276	<i>C.tropicalis</i>	Nefreketomi, laparotomi	1931	Blodkultur
42936	<i>C.albicans</i>	Residiverende sopp øsofagitt HIV infeksjon	1953	Halsprøve
30614	<i>C.albicans</i>	Hypogammaglobulinemi	1940	Øreprøve
18639	<i>C.albicans</i>	Addison, hypoparathyroidisme	1957	Halsprøve
70932	<i>Candida spp.</i>		1972	Blodkultur
64279	<i>C.albicans</i>	Mistenkt soppinfeksjon	1981	Halsprøve
4180	<i>C.famata</i>	KML, Benmarstransplantasjon	1949	Blodkultur
42830	<i>Candida spp.</i>	- (RH kir B post 3)	1968	Væske fra abdomen

2.1.2 Referansestammer

Tabell 3. Referansestammer

Prøvenummer	Art	Kilde
Ref.	<i>C.parapsilosis</i>	Per Sandven, Nasjonalt folkehelse institutt
Ref.	<i>C.glabrata</i>	Per Sandven, Nasjonalt folkehelse institutt
19265.	<i>A.fumigatus</i>	Per Sandven, Nasjonalt folkehelse institutt
64550	<i>C.albicans</i>	Per Sandven, Nasjonalt folkehelse institutt
90028	<i>C.albicans</i>	Per Sandven, Nasjonalt folkehelse institutt
91152	<i>C.parapsilosis</i>	Egil Lingaas
91176	<i>C.krusei</i>	Egil Lingaas

2.1.3 Prøver fra Veterinærinstituttet

Tabell 4. Muggsopp-isolater fra Veterinærinstituttet ved Ida Skaar

Prøvenummer	Art
01213	<i>A.niger</i>
01216	<i>A.niger</i>
01385	<i>A.carbonarius</i>
01384	<i>A.carbonarius</i>
01383	<i>A.carbonarius</i>
K324	<i>P.commune</i>
K789	<i>P.commune</i>
K150	<i>P.palitans</i>
K60	<i>P.palitans</i>
K286	<i>P.palitans</i>
K155	<i>P.palitans</i>
K643-12	<i>P.commune</i>
K643-11	<i>P.commune</i>
K643-9	<i>P.palitans</i>
K643-8	<i>P.palitans</i>
K642-5	<i>P.palitans</i>
K796-1	<i>P.commune</i>
#10	<i>S.brevicaulis</i>
#18	<i>S.brevicaulis</i>

2.2 Dyrkningsmedier

Dyrkning ble utført på Saboraud/glukose medium (inneholder 4 % glukose, pH 5,6)¹² ved 28°C. Soppisolatene ble frosset i 12 % glyserol-glukose buljong ved -70°C.

2.3 Konvensjonelle diagnostiske tester

2.3.1 CHROMagar

Gjærsopp isolatene ble fra frossen tilstand sådd ut på CKROMagar Candida. Skålene ble inkubert ved 28°C i 48 timer før de ble avlest. Avlesningen ble gjort med en kjent *Candida albicans* stamme som positiv kontroll. Den positive kontrollen har en grå-grønn farge. Prøver som hadde (tilnærmet) samme farge som kontrollen ble definert som CHROM positive. Prøver som hadde en annen farge ble erklært CROM negative. De negative prøvene ble forsøkt identifisert ved API 20 C AUX og VITEK 2.

CROMagar inneholder:
Pepton, glukose, kloramfenikol

2.3.2 API 20 C AUX

Gjærsopp isolatene ble sådd ut på Saboraud/glukose skål og inkubert ved 28°C i to dager før de ble høstet og en løsning med tetthet tilnærmet lik en standardløsning (tetthet ca. 2 McFarland) ble laget i 0,85 % NaCl fra fabrikanten (BioMerieux). Løsningen ble deretter distribuert på API 20 C AUX strips'en som fra før av var lagt i fuktet plastbeholder. Hver plastlomme inneholder et substrat egnet for soppidentifikasjon. Strips'ene ble inkubert ved 28°C og lest av etter 48 timer av to personer uavhengig av hverandre. Når man ikke fikk noen identifikasjon etter 48 timer, ble prøvene igjen lest av etter 72 timer. Hvis en av avlesningene ga en identifikasjon ble denne brukt. Hvis de ga forskjellig identifikasjon, ble prøven satt opp igjen.

Medier på strips: Glukose, Glyserol, 2-Keto-D-Gluconat, L-Arabinose, D-Xylose, Adonitol, Xylitol, Galaktose, Inositol, Sorbitol, α -Metyl-D-Glukose, N-Acetyl-D-Glukosamin, Celiobiose, Laktose, Maltose, Saccharose/sukrose, Trehalose, Melezitose, Raffinose.

2.3.3 VITEK 2

Gjærsopp isolatene ble sådd ut på Saboraud/glukose skål og inkubert ved 28°C i to dager før de ble høstet og en løsning i 0,45 % NaCl med tetthet 0,50-0,62 McFarland ble laget til VITEK 2. Et ID-YST kort (BioMerieux) ble brukt ved VITEK 2-identifikasjonen

VITEK 2 (Biomerieux) er et automatisert identifikasjonssystem for bakterier og sopp som omfatter følgende del-tester:

ACTa, ADOa, dTREa, NAGa, dCELa, DULa, dGALa, dGLUa, LACa, MAdGa, dMALa, dMANa, dMELa, dMLZa, PLEa, dRAFa, IRHAa, SACa, SALa, ISBEa, sSORa, NO3a, GlyA, CITa, dGATa, dGNTa, HypA, LATa, MMESa, SUCTa, AGAL, AGLU, AMAN, BGAL, BGLU, BGUR, BNAG, LAA, BXYL, PHOS, GGT, HisA, IleA, ProA, ValA, URE.

2.4 Molekylære diagnostiske metoder

2.4.1 Isolering av DNA

Alle sopp isolatene ble sådd ut på Saboraud/glukose skåler og inkubert ved 28°C to dager før DNA-isolering.

QIAamp DNA mini kit, en protokoll beregnet på klinisk prøvemateriale (Body fluid protocol) ble fulgt. Noen soppkolonier ble høstet og løst i 200 µl ddH₂O i et Eppendorf rør. Det ble tilsatt 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) og 200 µl AL lysis buffer og blandet godt, før røret ble inkubert ved 56°C i 10 min. 200 µl 96% etanol ble så tilsatt og løsningen blandet og overført til en QIAamp spin kolonne. Det ble så sentrifugert på 8000 rpm i 1 minutt. Spin kolonnen ble så plassert i et nytt 2 ml samlerør og tilsatt 500 µl AW1 buffer og sentrifugert på 8000rpm i 1 minutt. Spin kolonnen ble igjen plassert i et nytt samlerør og det ble tilsatt 500 µl AW2 buffer og sentrifugert på 13000 rpm i 3 min. Deretter ble spin kolonnen plassert i et Eppendorf rør og tilsatt 100 µl AE buffer, inkubert i 5 min og tilslutt sentrifugert på 8000 rpm i 1 minutt. Det rensede DNA'et ble inkubert ved 65°C i 10 min, og lagret ved -18°C til det ble brukt som templat i PCR.

Materiale:

QIAamp DNA mini kit (QIAGEN):

ddH₂O

Proteinase K (20 mg/ml)

AL lysis buffer (guanidine hydrochloride)

96 % etanol

AW1 buffer (guanidine hydrochloride, etanol)

AW2 buffer

AE eluerings buffer

2.4.2 PCR

2.4.2.1 Primere:

Tabell 5. Primere brukt til PCR

Primer	Omeråde	Sekvens	Fabrikant
1400	18 S rDNA	cag agg tga aat tct tgg a	Pedersen & Sønn
1403	18 S rDNA	caa atc act cca cca act	Pedersen & Sønn
TR3	18 S rDNA	gcg gta att cca gct cca	Invitrogen
TR4	18 S rDNA	tgg tta aga cta cga cgg	Invitrogen
NL1	26 S rDNA	gca tat caa taa gcg gag gaa aag	Invitrogen
NL4	26 S rDNA	ggt ccg tgt ttc aag acg g	Invitrogen

2.4.2.2 18 S PCR:

PCR reaksjoner med primere 1400 og 1403 (18 S rDNA)

7 µl templat ble tilsatt 43 µl mix bestående av:

5 µl 10xPCR buffer
3 µl dNTP (2,5 mM)
1,5 µl MgCl₂ (50 mM)
1 µl 1400 primer (3,5 pmol/µl)
2,5 µl 1403 primer (3,5 pmol/µl)
1 µl BioTaq DNA polymerase
30 µl ddH₂O

PCR rørene ble utsatt for 35 temperaturendringssyklus i en PTC-100 block thermocycler (MJ Research Inc.) Følgende program ble brukt: Denaturering ved 94°C i 30 s, annealing ved 53°C i 30 s og ekstensjon ved 72°C i 30 s. PCR-syklusene ble innledet av 2 min med denaturering ved 94°C og avsluttet med ekstensjon ved 72°C i 10 min.

PCR raskjoner med primere TR3 og TR4 (18 S rDNA)
1,0 µl templat ble tilsatt 24 µl mix bestående av:

2,5 µl 10xPCR buffer
2,0 µl dNTP (2,5 mM)
0,7 µl MgCl₂ (50 mM)
2,5 µl TR3 primer (3,5 pmol/µl)
2,5 µl TR4 primer (3,5 pmol/µl)
0,3 µl BioTaq DNA polymerase
13,5 µl ddH₂O

PCR rørene ble utsatt for 35 temperaturendringssyklus i en PTC-100 block thermocycler (MJ Research Inc.) Følgende program ble brukt: Denaturering ved 95°C i 20 s, annealing ved 58°C i 20 s og ekstensjon ved 72°C i 30 s. PCR-syklusene ble innledet av 3 min med denaturering ved 95°C og avsluttet med ekstensjon ved 72°C i 7 min.

Materiale:

10xPCR buf. (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-Hcl(pH 8,8 ved 25 C°), 0,1% Tween-20, Bioline Ldt, USA)
dNTP (2,5 mM)
MgCl₂ (50 mM, Bioline Ldt, USA)
BIOTAQ DNA polymerase (Bioline Ldt, USA)
ddH₂O

2.4.2.3 26 S PCR:

PCR reaksjoner med primere NL1 og NL4 (26 S rDNA)
4 µl templat ble tilsatt 46 µl mix bestående av:

5 µl 10xPCR buffer (100 mM Tris-Hcl (pH 8,8 ved 25 C°), 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl og 1,0 % Triton x-100)
4 µl dNTP (2,5 mM)
5 µl NL1 primer (3,5 pmol/ml)
5 µl NL4 primer (3,5 pmol/ml)
0,75 µl DyNAzyme II DNA polymerase (Finnzymes)

26,25 µl ddH₂O

PCR rørene ble utsatt for 35 temperaturendringssyklus i en PTC-200 thermocycler på blokk instilling (MJ Research Inc.) Følgende program ble brukt: Denaturering ved 94°C i 30 s, annealing ved 58°C i 30 s og ekstensjon ved 72°C i 90 s. PCR-syklusene ble innledet av 2 min med denaturering ved 94°C og avsluttet med ekstensjon ved 72°C i 10 min.

Materiale:

10xPCR buf. (100 mM Tris-Hcl (pH 8,8 ved 25 C°), 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl og 1,0 % Triton x-100, Finnzymes)
dNTP (2,5 mM)
DyNAzyme II DNA polymerase (Finnzymes)
ddH₂O

2.4.3 Gel elektroforese

PCR produktet ble lagret ved -4°C til gel elektroforese. 5 µl av PCR produktet ble blandet med 6x loading buffer og applisert i brønner på en 1 % agarose gel med 0,5 µg/ml ethidiumbromid. 4 µl low DNA mass ladder ble aplisert i brønn 1. Gelen ble kjørt på 100 V i 30 min, og DNA ble deretter visualisert med UV-bestråling.

Materiale:

Seakem LE agarose
1xTBE (Tris-Borak-EDTA elektroforese buffer)
Ethidiumbromid (0,5 µg/ml, CLP, San Diego Ca. USA)
Low DNA mass ladder (Invitrogen)

2.4.4 Rensing av PCR produkt

PCR produktet ble rensert for primere med Microspin S-300 Hr kolonner (Amersham Biosciences). Kolonnene ble tatt ut av kjøleskapet og vortex'et til en jevn løsning. Deretter ble bunnen "kneppet" av og røret plassert i et Eppendorfrør og sentrifugert i 1 minutt. Kolonnene ble deretter plassert i et nytt Eppendorfrør, PCR produktet ble applisert og deretter ble det sentrifugert med en bordsentrifuge i 2 min. Eppendorfrørene med det rensede PCR produktet ble inkubert ved 65°C i 10 min. Det rensede produktet ble lagret ved -18°C til DNA-sekvensering.

Materiale:

Microspin S-300 HR kolonner (Amersham pharmacia biotech)

2.4.5 DNA sekvensering

DNA-sekvensering ble utført med CEQ 8000 genetic analysis system (Beckman Coulter), og det ble fulgt en protokoll fra produsent: Ca. 40 ng rensert PCR-produkt ble blandet med 1 pmol primer, 8 µl DTCS Quick start mix og ddH₂O til 20 µl for hver DNA-sekvenseringsreaksjon. Det ble brukt en Perkin Elmer PCR GeneAmp PCR system 9600 maskin for PCR baserte DNA-sekvenseringsreaksjoner. PCR-syklusene besto av 30 sykluser med 20 s denaturering ved 96°C, 20 s annealing ved 50°C og 4 min ekstensjon ved 60°C. Etter DNA-sekvenseringsreaksjonen ble det tilsatt 5 µl stopp-løsning og 60 µl 96 % etanol for utfelling av DNA. Løsningen ble blandet godt og sentrifugert ved 3500 rcf i 10 min. Prøvene

ble så vendt opp-ned og sentrifugert ut ved 300 rcf i 20 s slik at supernatanten ble forsiktig fjernet. Deretter ble det vasket to ganger med etanol: 200 µl 70 % etanol ble tilsatt og sentrifugert ved 3500 rcf i 3 min før rørene ble snudd opp-ned igjen og sentrifugert ved 300rcf i 20 s. Prøvene fikk så stå rundt 40 min til den resterende etanolen var fordampnet. Etter det ble tilsatt 40 µl sample loading solution og lagt på en dråpe olje for å hindre fordampning. Prøvene ble deretter analysert ved hjelp av en CEQ 8000 DNA-sekvenserings-maskin.

Materiale:

ddH₂O

DTCS quick start master mix (Beckman Coulter)

3 M Natriumacetat (C₂H₃O₂Na, SIGMA)

0,1 M EDTA pH 8

Glykogen (20 mg/ml)

96 % etanol

70 % etanol

Sample loading solution (Beckman Coulter)

Mineral olje (Beckman Coulter)

CEQ seC.parapsilosisation buffer (Beckman Coulter)

2.5 Resistensbestemmelse

Følsomhet for fluconazole og voriconazole ble testet for alle gjærsoppisolater med en disk diffusjons-metode og E-test. Noen soppkolonier ble løst i saltvann og innstilt til en turbiditet på 0,5 McFarland ved hjelp av spektrofotometer i henhold til NCCLS metoden. En steril bommulspinne ble dyppet i løsningen og så strøket over Mueller-Hinton agaren i tre retninger. Platene fikk så tørke i 15 min før diffusjons lappene og E-test stripene ble lagt på. Platene ble så inkubert ved romtemperatur i 30 min før de ble inkubert ved 37 °C og avlest etter 24 og 48 timer. Disk diffusjons-skålene ble avlest maskinelt med spektrofotometer ved 570 nm, MIC ble definert som 50% redusert vekst. E-testen ble avlest på øyemål og MIC ble definert til 80%.

Materiale:

E-test fluconazole (0,016-256 µg/ml) og voriconazole (0,002-32 µg/ml) (AB biodisk , Solna, Sverige)

Difusjons diskker, fluconazole 25 µg og voriconazole 1 µg, (Becton Dickinson Microbiology systems, Cockeysille, Md)

Mueller-Hinton agar med 2% glucose og 0,5 mg/l metylenblå tilsatt per ml.

3 Resultater

3.1 Identifikasjon av soppisolater ved bruk av konvensjonelle metoder

Sopp isolatene ble først identifisert ved konvensjonelle metoder i form av CHROMagar, API 20 C AUX identifikasjons-strips og det (semi-)automatisert identifikasjonssystemet VITEK 2.

3.1.1 CHROMagar

Alle 40 gjærsoppisolater ble testet med CHROMagar. Av de 23 isolatene som tidligere var identifisert som *Candida albicans* var 21 positive. De to CHROM negative isolatene ble ikke identifisert som *C. albicans* ved noen av de andre metodene. Alle de 17 isolatene med en annen tentativ artsdiagnose enn *C. albicans* var CHROM negative. De 21 CHROM positive isolatene ble identifisert som *C. albicans* med molekylær metodikk (se nedenfor). De 19 CHROM negative isolatene ble alle senere identifisert som non-*C. albicans* ved molekylær metodikk (se nedenfor).

3.1.2 API 20 C AUX

Av de 40 gjærsoppisolatene ble de 19 CHROM negative isolatene testet med API 20 C AUX. Av disse ble 7 identifisert til artsnivå, mens 12 ikke ble klassifisert. 5 isolater fikk samme arts-identifikasjon som ble oppnådd ved den molekylære diagnostikken. 2 isolater fikk en annen artsbetegnelse enn den oppnådd med molekylær metodikk. Begge disse ble klassifisert som *Candida famata* ved API 20 C AUX, mens den molekylære metodikken klassifiserte de som *Candida tropicalis*.

3.1.3 VITEK 2

Av de 40 gjærsoppisolatene ble de 19 CHROM negative og 4 tilfeldig utvalgte *C. albicans* testet ved VITEK 2 analyse (totalt 23 isolater). Av de 23 isolatene fikk 19 isolater samme artsbetegnelse ved VITEK 2 og molekylær metodikk. I 2 tilfeller var det ikke overenstemmelse mellom VITEK 2 og molekylær identifisering. I de to siste tilfellene (23172I, 42830) beregnet VITEK 2 like stor sannsynlighet for to arter, den ene av dem i overenstemmelse med sekvenseringen (henholdsvis *C. guilliermondi* og *C. norvegensis*). En av de feilidentifiserte var referanseisolatet for *C. parapsilosis* som ved VITEK 2 ble identifisert som *C. membranefaciens*. Det siste isolatet som fikk en annen identifikasjon var 42276, som ved VITEK 2 ble identifisert som *C. tropicalis* og ved 18S rDNA sekvensering som *C. sojae* (Tabell 6 og 7). Disse to artene er imidlertid svært nært beslektede og skiller seg kun fra hverandre med et basepar i den undersøkte regionen.

3.2 Molekylær identifikasjon ved ribosomal PCR-sekvensering

To ribosomale DNA-sekvensområder ble brukt som mål for PCR-sekvensering: 18S og 26S rDNA (Figur 1).

3.2.1 18S rDNA PCR sekvensering med 1400-1403 primere

PCR sekvenseringen med disse primerene fungerte godt på alle sopp isolatene som ble testet (Tabell 7). Imidlertid var mange DNA sekvenser fra ulike sopparter identiske, og derfor var oppløseligheten av dette 18 S rDNA-sekvensområdet svært dårlig

3.2.2 18S rDNA PCR sekvensering med TR3-TR4 primere

Alle isolatene ble analysert ved PCR sekvensering med TR3-TR4 primer settet. Blandt gjærsoppene var oppløseligheten god nok til å artsbestemme de fleste soppisolatene. I dette området er det ikke mulig å skille mellom *C. krusei* og *C. norvegensis*. Muggsoppisolatene kunne med få unntak kun bestemmes til slektsnivå.

Av de 52 kliniske isolatene var det 5 isolater som fikk en annen artsidentifikasjon enn den tentative (22338, 23172I, 24980, 25186, 34306, 42276). 6 isolater hadde ingen tentativ artsdiagnose, de var kun identifisert til slektsnivå som *Candida spp.* ved konvensjonell

diagnostikk. Disse ble identifisert til artsnivå i denne delen av studien. Alle referanse isolatene fikk samme identifikasjon som opprinnelig oppgitt av referanselaboratoriet. *Penicillium palitans*-isolatene ble sekvensert, men det fantes ingen *P. pallitans* sekvenser i BLAST databasen. *Penicillium commune* isolatene kunne kun identifiseres til slektsnivå. *Saprolegnia brevicaulis* ble identifisert til artsnivå.

Ved gjærsopp alignmentet skilte en gruppe med *C. albicans* (N=4) og *C. norvegensis* (N=1) seg ut med en delesjon på 8 basepar og 2 insersjoner på henholdsvis 2 og 4 basepar. En gruppe med *C. glabrata* (N=6) og *S. cerevisiae* (N=1) hadde to insersjoner på 8 basepar som lå 5 basepar fra hverandre. Alignmentet av muggsoppsekvensene viste en gruppe *P. palitans* (N=2) og *S. brevicaulis* (N=1) med to delesjoner (3 og 2 basepar) og 3 insersjoner (3, 2 og 5 basepar). En gruppe med *A. corymbifera* (N=1) og *S. brevicaulis* (N=1) hadde 5 insersjoner (3, 4, 2, 2 og 1 basepar). Insersjonene hadde dog ikke samme sekvens noen av stedene.

3.2.3 26S rDNA PCR sekvensering med NL1-NL4 primere

PCR-reaksjonen var i utgangspunktet lite robust. Ved hjelp av flere forsøk ble det likevel oppnådd PCR produkter for alle sopp-isolatene inkludert i studien (*Saprolegnia brevicaulis* ble ikke ble testet). DNA-sekvenseringen ga fine resultater med primer NL1, men ingen, eller svært dårlig sekvenser, med primer NL4. Oppløseligheten med 26S rDNA som target-DNA var langt større enn i det 18S rDNA baserte TR3-TR4 område, men det var fortsatt ikke god nok oppløselighet til å skjelne muggsoppisolatene fra hverandre. De 12 26S rDNA baserte sekvensene (produsert med kun NL1 primeren) ga samme artsidentifikasjon som TR3-TR4 sekvensene.

Gjærsopp alignmentet viste to delesjoner (1 og 4 basepar) for en gruppe med *C. albicans* (N=2) og *C. kruisi* (N=1). *C. kruisi* hadde i tillegg to delesjoner på henholdsvis 7 og 37 basepar. En gruppe med *C. glabrata* (N=2) og *S. cerevisiae* (N=1) hadde 3 insersjoner på 2 basepar. *C. membranefaciens* (N=1) hadde to delesjoner på henholdsvis 10 og 15 basepar. *C. tropicalis* (N=1) hadde en delesjon på 4 basepar. Muggsopp alignmentet viste 2 insersjoner på 1 basepar for *A. fumigatus* (N=1).

Tabell 6. Identifikasjon av soppisolater ved bruk av konvensjonelle metoder (i.i=ikke identifisert).

Prøve-nummer	Artsidentifikasjon fra rutinelaboratorium	Konvensjonell diagnostikk		
		Egen CHROM	Egen API	Egen VITEK 2
Ref.	<i>C.parapsilosis</i>	-	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.membranefaciens</i>
Ref.	<i>C.glabrata</i>	-	i.i	<i>C.glabrata</i>
1086	<i>C.krusei</i>	-	i.i	<i>C.krusei</i>
2663	<i>C.albicans</i>	+		
3557	<i>C.albicans</i>	+		
3774	<i>C.krusei</i>	-	i.i	<i>C.krusei</i>
4180	<i>Candida spp.</i>	-	<i>C.famata</i>	<i>C.tropicalis</i>
5641	<i>C.glabrata</i>	-	i.i	<i>C.glabrata</i>
11309	<i>C.parapsilosis</i>	-	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.parapsilosis</i>
16437	<i>C.albicans</i>	+		
18639	<i>C.albicans</i>	+		<i>C.albicans</i>
19343	<i>C.albicans</i>	+		
22234	<i>C.albicans</i>	+		
23172I	<i>C.albicans</i>	-	i.i	<i>C.guillermondi/ C.lusitanie</i>
23172II	<i>C.parapsilosis</i>	-	i.i	<i>C.parapsilosis</i>
24389	<i>C.glabrata</i>	-	<i>C.glabrata</i>	<i>C.glabrata</i>

24684I	<i>Candida spp.</i>	-	<i>C.famata</i>	<i>C.tropicalis</i>
24684II	<i>C.albicans</i>	+		
24698	<i>C.albicans</i>	+		
24821	<i>C.albicans</i>	+		
24963	<i>C.albicans</i>	+		
24980	<i>C.inconspicua</i>	-	<i>C.krusei</i>	<i>C.krusei</i>
25015	<i>C.albicans</i>	+		
25186	<i>C.albicans</i>	-	i.i	<i>C.parapsilosis</i>
25760	<i>S.cervisae</i>	-	i.i	<i>S.cervisae</i>
26391	<i>C.albicans</i>	+		
26746	<i>C.glabrata</i>	-	i.i	<i>C.glabrata</i>
30064	<i>C.glabrata</i>	-	<i>C.glabrata</i>	<i>C.glabrata</i>
30613	<i>C.albicans</i>	+		<i>C.albicans</i>
34504	<i>C.albicans</i>	+		
35228	<i>C.glabrata</i>	-	i.i	<i>C.glabrata</i>
35479	<i>C.albicans</i>	+		
35526	<i>C.albicans</i>	+		
42276	<i>C.tropicalis</i>	-	i.i	<i>C.tropicalis</i>
42830	<i>Candida spp.</i>	-	i.i	<i>C.inconspicua/ C.norvegensis</i>
42936	<i>C.albicans</i>	+		
64279	<i>C.albicans</i>	+		<i>C.albicans</i>
64550	<i>C.albicans</i>	+		
70932	<i>Candida spp.</i>	+		<i>C.albicans</i>
90028	<i>C.albicans</i>	+		

Tabell 7. Identifikasjon av soppisolater ved ribosomal PCR-sekvensering og påfølgende BLAST-søk.

Prøvenummer	Tentativ Art	18 S PCR		26 S PCR
		1400-1403	TR3-TR4	NL1-NL4
1086	<i>C.krusei</i>		<i>C.krusei</i>	
2663	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	
3557	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i> *	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i> ^ψ
3774	<i>C.krusei</i>		<i>C.krusei</i> *	
4180	<i>C.tropicalis</i>		<i>C.tropicalis</i>	
5641	<i>C.glabrata</i>		<i>C.glabrata</i>	<i>C.glabrata</i> [§]
8359	<i>A.fumigatus</i>		<i>A.fumigatus</i> *	
10630	<i>A.fumigatus</i>		<i>A.fumigatus</i> *	
11309	<i>C.parapsilosis</i>		<i>C.parapsilosis</i>	
11833	<i>A.fumigatus</i>		<i>A.fumigatus</i> *	
16081	<i>A.fumigatus</i>		<i>A.fumigatus</i> *	<i>A.fumigatus</i> ^ψ
16437	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i> *	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i> ^ψ
16781	<i>A.fumigatus</i>		<i>A.fumigatus</i> *	
17414	<i>A.fumigatus</i>		<i>A.fumigatus</i> *	
17953	<i>A.corymbifera</i>		<i>A.corymbifera</i>	
18639	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	
19343	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i> ^ψ
20664	<i>A.niger</i>		<i>A.niger</i> *	
21992	<i>A.fumigatus</i>		<i>A.fumigatus</i> *	
22234	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i> ^ψ
22338	<i>A.terreus</i>		<i>A.fumigatus</i> *	
23172I	<i>C.guilemondi</i>		<i>C.guilemondi</i>	
23172II	<i>C.parapsilosis</i>		<i>C.parapsilosis</i>	
24362	<i>S.brevicaulis</i>		<i>S.brevicaulis</i>	
24389	<i>C.glabrata</i>		<i>C.glabrata</i>	
24684I	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.tropicalis</i> *	<i>C.tropicalis</i>	

24684II	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	
24698	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i> *	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i> ^ψ
24821	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	
24963	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i> *	<i>C.albicans</i>	
24980	<i>C.krusei</i>		<i>C.krusei</i> *	
25015	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	
25186	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.albicans</i> *	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.parapsilosis</i> ^ψ
25760	<i>S.cervisae</i>		<i>S.cervisae</i>	<i>S.cervisae</i> ^ψ
25984	<i>A.fumigatus</i>	<i>A.fumigatus</i> *	<i>A.fumigatus</i> *	
26391	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i> ^ψ
26746	<i>C.glabrata</i>		<i>C.glabrata</i>	
30064	<i>C.glabrata</i>		<i>C.glabrata</i>	
30613	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	
33301	<i>A.fumigatus</i>		<i>A.fumigatus</i> *	
34306	<i>A.niger</i>		<i>A.fumigatus</i> *	
34504	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	
34888	<i>A.fumigatus</i>		<i>A.fumigatus</i> *	
35228	<i>C.glabrata</i>		<i>C.glabrata</i>	<i>C.glabrata</i> ^ψ
35479	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	
35526	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	
40928	<i>A.fumigatus</i>		<i>A.fumigatus</i> *	
42276	<i>C.tropicalis</i>		<i>C.sojae</i>	
42830	<i>C.norvegensis</i>		<i>C.norvegensis</i>	
42936	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	
64279	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	
70932	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	
Ref.	<i>C.parapsilosis</i>		<i>C.parapsilosis</i>	
Ref.	<i>C.glabrata</i>		<i>C.glabrata</i>	
13301 (ref.)	<i>A.fumigatus</i>		<i>A.fumigatus</i> *	
19265 (ref.)	<i>A.fumigatus</i>		<i>A.fumigatus</i> *	
64550 (ref.)	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	
90028 (ref.)	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>	
01216	<i>A.niger</i>		<i>A.niger</i> *	
01213	<i>A.niger</i>		<i>A.niger</i> *	
01383	<i>A.carbonarius</i>		<i>Penicillium spp.</i> *	
01384	<i>A.carbonarius</i>		<i>Penicillium spp.</i> *	
01385	<i>A.carbonarius</i>		<i>Penicillium spp.</i> *	
K324	<i>P.commune</i>		<i>P.commune</i> *	
K789	<i>P.commune</i>		<i>P.commune</i> *	
K150	<i>P.palitans</i>		<i>P.commune</i> *	
K60	<i>P.palitans</i>		<i>P.commune</i> *	
K286	<i>P.palitans</i>		<i>P.commune</i> *	<i>P.commune</i> ^{*ψ}
K155	<i>P.palitans</i>		<i>P.commune</i> *	
K643-12	<i>P.commune</i>		<i>P.commune</i> *	
K643-11	<i>P.commune</i>		<i>P.commune</i> *	
K643-9	<i>P.palitans</i>		<i>P.commune</i> *	
K643-8	<i>P.palitans</i>		<i>P.commune</i> *	
K642-5	<i>P.palitans</i>		<i>P.commune</i> *	
K796-1	<i>P.commune</i>		<i>P.commune</i> *	
#10	<i>S.brevicaulis</i>		<i>S.brevicaulis</i>	
#18	<i>S.brevicaulis</i>		<i>S.brevicaulis</i> [§]	

*Flere likeverdige alternativer i blast

§En DNA tråd, ikke full match

ψEn DNA tråd, full match

3.3 Resistensbestemmelse av gjærsopp mot voriconazole og fluconazole

For fluconazole ble isolatene etter testing karakterisert som sensitive (S), intermediære (I) eller resistente (R). For voriconazole er det ennå ikke etablert sensitivitetsgrenser, MIC verdiene er derfor oppgitt. Resultatene er vist i Tabell 8. Det var god overenstemmelse mellom de to metodene. For fluconazole ble 83,3% plassert i tilsvarende kategori og for voriconazole 90,4%. De fleste uoverstemmelsene var av mindre karakter (dvs, mindre enn 4 fortyndinger). Det var en tendes til at MIC verdiene for voriconazole var skiftet mot lavere verdier ved E-testanalysene. Resultatene for alle referanseisolatene i studien var innenfor tidligere publiserte grenser¹³. Kun ett *C. albicans* isolat var resistent mot voriconazole. Dette isolatet kom fra en pasient med HIV og residiverende fluconazole behandlede soppinfeksjoner. Dette isolatet og fire andre *C. albicans* var resistente mot fluconazole. Økt resistens mot fluconazole ble også funnet for *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. norvegensis* og *S. cerevisiae*. Disse artene var mindre resistente for voriconazole.

Tabell 8. Fluconazole/Voriconazole resistenstest

Prøvenr.	Art	Lappetest		E-test	
		Flu	Vor	Flu	Vor
1086	<i>C.krusei</i>	R	2,0	R	1,0
2663	<i>C.albicans</i>	S	0,02	R	0,008
3557	<i>C.albicans</i>	S	0,01	S	0,006
3774	<i>C.krusei</i>	R	1,5	S-D/1	0,25
4180	<i>C.tropicalis</i>	S	0,06	S	0,38
5641	<i>C.glabrata</i>	R	2,0	S-D/1	0,125
11309	<i>C.parapsilosis</i>	S	<0,01	S	0,023
16437	<i>C.albicans</i>	S	0,03	S	0,016
18639	<i>C.albicans</i>	R	>4,8	R	0,75
19343	<i>C.albicans</i>	S	0,03	S	0,016
22234	<i>C.albicans</i>	S	0,01	S	0,016
23172I	<i>C.guilermondi</i>	S	<0,01	S	0,064
23172II	<i>C.parapsilosis</i>	S	<0,01	S	0,047
24389	<i>C.glabrata</i>	S	0,15	S-D/1	0,25
24684I	<i>C.tropicalis</i>	S	0,01	S	0,094
24684II	<i>C.albicans</i>	S	0,06	S	0,006
24698	<i>C.albicans</i>	S-D/1	0,06	S	0,012
24821	<i>C.albicans</i>	S	0,03	S-D/1	0,25
24963	<i>C.albicans</i>	S	0,01	S	0,016
24980	<i>C.krusei</i>	R	0,26	R	0,25
25015	<i>C.albicans</i>	S	0,35	S	0,064
25186	<i>C.parapsilosis</i>	S	<0,01	S	0,032
25760	<i>S.cerevisiae</i>	S	0,02	S-D/1	0,125
26391	<i>C.albicans</i>	S-D/1	0,84	R	0,064
26746	<i>C.glabrata</i>	S	0,26	R	1,0
30064	<i>C.glabrata</i>	S	0,03	S-D/1	0,125
30613	<i>C.albicans</i>	S	0,11	S	0,047
34504	<i>C.albicans</i>	S	0,06	R	>32
35228	<i>C.glabrata</i>	S	0,01	S-D/1	0,19
35479	<i>C.albicans</i>	S	<0,01	S	0,047
35526	<i>C.albicans</i>	S	0,01	S	0,064
42276	<i>C.tropicalis</i>	S	<0,01	S	0,125
42830	<i>C.norvegensis</i>	R	0,08	R	0,25
42936	<i>C.albicans</i>	R	0,08	R	0,25
64279	<i>C.albicans</i>	S	0,03	S-D/1	0,094
64550	<i>C.albicans</i> (ref)	R	1,1	R	0,50
70932	<i>C.albicans</i>	S	<0,01	S	0,016

90018	<i>C.parapsilosis</i> (ref)	S	<0,01	S	0,012
90028	<i>C.albicans</i> (ref)	S	<0,01	S	0,125
90030	<i>C.glabrata</i> (ref)	S	0,63	S-D/1	0,25
91152	<i>C.parapsilosis</i>	S	0,01	S	0,008
91176.	<i>C.krusei</i>	R	1,5	R	0,38

4 Diskusjon

4.1 Generell diskusjon

Tall fra studier i flere land viser at nosokomiale soppinfeksjoner har blitt stadig hyppigere siden 1980 tallet¹⁴. Insidensen ser ut til å ha økt mest ved større universitetssykehus, men har også økt ved mindre lokalsykehus¹⁵. Forekomsten er størst i medisinske og kirurgiske avdelinger og er spesielt stor ved intensiv enheter¹⁶. *Candida* spp. er nå den fjerde hyppigste patogene organismen som blir isolert i blodkultur ved nosokomiale infeksjoner^{17,18}. Studier fra mange land kan tyde på at det foregår et skifte som gjør non-*albicans* infeksjoner vanligere¹⁹. Et slikt skifte ville være alvorlig ettersom det er kjent at noen av non-*albicans* artene, f.eks *C. krusei* og *C. glabrata* har større resistens mot fluconazole som er førstevalg ved invasive soppinfeksjoner²⁰. Etter 1996 er det ikke publisert noen undersøkelser som belyser insidensen i Norge, men en prospektiv studie av insidensen i Norge mellom 1991 og 1996 viste ingen økt insidens av fungemi²¹. Denne undersøkelsen viste heller ikke noe skifte i organismer fra *C. albicans* mot non-*albicans*.

Det er mulig at tidlig adekvat antimykotisk behandling vil bedre forløpet av de invasive infeksjonene. Her ligger den største begrensningen til den kulturbaserte konvensjonelle diagnostikken ved at det som oftest tar minst 48 timer å påvise sopp i klinisk prøvemateriale, og deretter ofte minst 24 timer for å kunne artsidentifisere soppen. Ved molekylær diagnostikk er det vist at tiden fra prøvetaking til påvist mikrobe kan reduseres til 8 timer²². Dette vil kunne gi bedre behandlingsregimer for pasienter og dermed redusere morbiditet og mortalitet.

4.2 Diskusjon av metodologi

4.2.1 Konvensjonell identifikasjon

Denne studien underbygger CHROMagar's posisjon som en pålitelig og velegnet metode for å skille mellom *C. albicans* og andre gjærsopparter, noe også tidligere studier har vist²³. I følge produsent skal den også være i stand til å skille ut *C. krusei* og *C. tropicalis*²⁴. Dette ble ikke undersøkt i denne studien. Testen er i tillegg rask og enkel å utføre samt kostandseffektiv²⁵.

I denne studien viste utprøvingen av API 20 C AUX dårlige sensitivitet ettersom 12 av 19 isolater ikke ble identifisert. Tidligere evalueringer av testen har imidlertid gitt langt bedre resultater²⁶. Det er vanskelig å svare på hvorfor resultatene i denne studien var så mye dårligere. Vår erfaring med testen er at det var stor variasjon mellom avlesning av forskjellige personer, fordi bedømmelsen av turbiditet er vanskelig. Testen er også mer arbeidskrevende og kan ta lenger tid (72 timers inkubasjon ofte nødvendig) enn CHROMagar.

VITEK 2 hadde en mye bedre sensitivitet enn API 20 C AUX, den er i tillegg mindre arbeidskrevende, gir raskere svar og er enklere å tolke. VITEK 2 er klart den raskeste av de konvensjonelle identifikasjonsmetodene som finnes til nå. Andre større studier har vist at VITEK 2 har god sensitivitet og spesifisitet²⁷ i forhold til andre tester, men kostnadene til utstyr og reagenser er også betydelig høyere. De to tilfellene hvor VITEK 2 ikke klarte å skille mellom to arter (*C. guilliermondi*/*C. lusitaniae* og *C. inconspicua*/*C. norvegensis*) vil i praksis ikke ha stor betydning, ettersom behandlingen hadde blitt den samme uavhengig av hvilket av de to alternativene som var riktig. Mer bekymringsfull er feilidentifiseringen av referanseisolatet *C. parapsilosis*.

I konklusjon kan man si at CHROMagar og VITEK 2 er gode metoder for å artsbestemme gjærsopp fra kultur. I forhold til CHROMagar har VITEK 2 fordelen at den er raskere og kan bestemme flere arter til artsnivå. De lave kostnadene kombinert med den høye forekomsten av *C. albicans*, som fortsatt er vanligst, vil derimot i mange laboratorier gjøre CHROMagar til en gunstig test. Betydningen av identifikasjon til artsnivå for valg av antimykotisk legemiddel bør også være med å bestemme hvilken test det er rasjonelt å bruke. Hvis det velges et regime med fluconazole for *C. albicans* og voriconazole for non-*albicans* vil CHROMagar være en nyttig test.

4.2.2 Molekylær identifikasjon

18S rDNA PCR og sekvensering med primerene 1400-1403 var vellykket, men oppløseligheten av området er for liten til at det har noen praktisk nytte ettersom hverken gjærsopp eller muggsopp kan identifiseres til artsnivå. Metoden var derfor ikke nyttig for artsidentifikasjon, men kan brukes til å påvise tilstedeværelse av sopp i prøver. For de få isolatene som ble sekvensert, var sekvensene imidlertid forenlige med dem man fikk ved bruk av TR3-TR4 primerene.

Ved hjelp av 18S rDNA sekvensering med TR3-TR4 primere identifiserte studien, eller ga ny identifikasjon til, 11 av 52 (21%) isolater som ved diagnosetidspunkt hadde fått en annen eller ingen artsidentifikasjon. Alle *Candida*-arter ble identifisert til artsnivå med unntak av *C. krusei* og *C. norvegensis*, som ikke kan skilles ved denne metoden. For muggsopp var oppløseligheten mye dårligere og metoden er dermed dårlig egnet for artsidentifikasjon av muggsopp. Metoden var robust og enkel å gjennomføre.

Metoden for 26S rDNA sekvensering med NL1-NL4 primerene var mindre robust. Etter gjentatte forsøke ble PCR produkt oppnådd for alle isolatene i studien, men relativt ofte fikk man et produkt av dårlig kvalitet eller ikke noe produkt. Sekvenseringen fikk man altså til bare med NL1 primer og det er derfor vanskelig å vurdere resultatene. Andre studier har vist god oppløselighet i dette området²⁸.

Internal transcribed spacer (ITS) regionene av rDNA (Figur 1) har enda større oppløselighet enn 26S og er et lovende område for molekylær diagnostikk. Forskjellige *Candida* arter kan identifiseres på grunnlag av ulik lengde i dette området²⁹.

På basis av diagnostikken med amplifikasjon av ribosomalt DNA har det blitt utviklet andre molekylære metoder. Bruk av FISH hevdes å kunne påvise *C. albicans* på 2,5 timer fra blodkulturflasker der sopp er sett ved gramfarging³⁰.

I løpet av de siste ti årene har det kommet en rekke publikasjoner som hevder å ha utviklet molekylær basert soppdiagnostikk med god sensitivitet og spesifisitet. Den største

begrensningen for molekylær diagnostikk synes å være fraværet av kommersielt tilgjengelige og standardiserte tester³¹.

4.3 Resistensbestemmelse

Studien underbygger at E-test er en enkel og valid metode for bestemmelse av resistens mot fluconazole og voriconazole. Dette er også blitt vist i tidligere studier for fluconazole³² og voriconazole³³. Resultatene viser et resistensmønster som ligner det tidligere funnet i Norge³⁴. Dog er det en relativt høy andel fluconazole resistente stammer i denne studien. Dette kan skyldes Rikshospitalets spesielle populasjon med mange immunkompromiterte pasienter som utsettes for flere soppinfeksjoner. Disse infeksjonene behandles ofte med fluconazole. Voriconazole viste i denne studien en høyere *in vitro* aktivitet mot de fluconazole resistente stammene. Dette gjør voriconazole til et aktuelt alternativ fremover.

4.4 Fremtidsperspektiver

Mye tyder på at fremtiden vil by på høyere prevalens av invasive soppinfeksjoner på grunn av en stadig større populasjon med immunkompromiterte pasienter kombinert med teknologiske fremskritt og økt gjennomsnittlig levealder. De siste års fremskritt innenfor diagnostikk og legemidler gir imidlertid håp om bedre behandlingsresultater.

5 Konklusjon

- VITEK 2 og CHROMagar er velegnede metoder for konvesjonell identifikasjon av sopp og var i denne studien overlegen API 20 C AUX.
- Identifikasjon med PCR og sekvensering av 18S rDNA kan identifisere gjærsopp tilfredstillende og har potensial for en raskere identifikasjon enn dagens konvesjonelle metoder.
- Testing av fluconazole og voriconazole resistens med E-test fungerer tilfredstillende.
- Voriconazole viste aktivitet mot fluconazoleresistente stammer.

6 Referanser

¹ Vincent JL, Anaissie E, Bruining H, Demajo W, el-Ebiary M, Haber J, Hiramatsu Y, Nitenberg G, Nystrom PO, Pittet D, Rogers T, Sandven P, Sganga G, Schaller MD, Solomkin J (1998). Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic Candida infection in surgical patients under intensive care. Intensive Care Med., Mar;24(3):206-16.

² Ellepola AN, Morrison CJ (2005). Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. J Microbiol., Feb;43 Spec No:65-84.

³ Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU (2002). Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. J Clin Microbiol., Jul;40(7):2483-9.

⁴ Martin C, Roberts D, van Der Weide M, Rossau R, Jannes G, Smith T, Maher M (2000). Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. J Clin Microbiol., Oct;38(10):3735-42.

-
- ⁵ Einsele H, Hebart H, Roller G, Loffler J, Rothenhofer I, Muller CA, Bowden RA, van Burik J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U (1997). Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. J Clin Microbiol., Jun;35(6):1353-60.
- ⁶ Shin JH, Nolte FS, Holloway BP, Morrison CJ (1999). Rapid identification of up to three *Candida* species in a single reaction tube by a 5' exonuclease assay using fluorescent DNA probes. J Clin Microbiol, Jan;37(1):165-70.
- ⁷ Maertens J, Verhaegen J, Demuyneck H, Brock P, Verhoef G, Vandenberghe P, Van Eldere J, Verbist L, Boogaerts M (1999). Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive Aspergillosis. J Clin Microbiol., Oct;37(10):3223-8.
- ⁸ Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ (2002). Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. Clin Infect Dis., Jan 1;34(1):7-14.
- ⁹ Williamson EC, Leeming JP, Palmer HM, Steward CG, Warnock D, Marks DI, Millar MR (2000). Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. Br J Haematol., Jan;108(1):132-9.
- ¹⁰ NCCLS (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard.. NCCLS document, M27-A2.
- ¹¹ Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts.. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Discussion document.
- ¹² Sandven P, Lassen J (1999). Importance of selective media for recovery of yeasts from clinical specimens. J Clin Microbiol., Nov;37(11):3731-2.
- ¹³ Nguyen MH, Peacock JE Jr, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Rinaldi MG, Yu VL (1996). The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. Am J Med., Jun;100(6):617-23.
- ¹⁴ Fraser VJ, Jones M, Dunkel J, Storfer S, Medoff G, Dunagan WC (1992). Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. Clin Infect Dis., Sep;15(3):414-21.
- ¹⁵ Torfoss D, Sandven P (2005). Invasive fungal infections at The Norwegian Radium Hospital 1998-2003. Scand J Infect Dis., 2005;37(8):585-589.
- ¹⁶ Beck-Sague C, Jarvis WR (1993). Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. J Infect Dis., May;167(5):1247-51.
- ¹⁷ Emori TG, Gaynes RP. (1993). An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev., Oct;6(4):428-42.
- ¹⁸ Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP (1998). National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. SCOPE Participant Group. Surveillance and Control of Pathogens of epidemiologic. Diagn Microbiol Infect Dis., Feb;30(2):121-9.
- ¹⁹ Fridkin SK, Jarvis WR (1996). Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev., Oct;9(4):499-511.
- ²⁰ Krcmery V, Barnes AJ (2002). Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect, Apr;50(4):243-60.

-
- ²¹ Sandven P, Bevanger L, Digranes A, Gaustad P, Haukland HH, Steinbakk M (1998). Constant low rate of fungemia in Norway, 1991 to 1996. The Norwegian Yeast Study Group. J Clin Microbiol., Dec;36(12):3455-9.
- ²² Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC (2001). Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. J Clin Microbiol., Oct;39(10):3466-71.
- ²³ Yucesoy M, Marol S (2003). Performance of CHROMAGAR candida and BIGGY agar for identification of yeast species. Ann Clin Microbiol Antimicrob., Oct 29;2:8.
- ²⁴ Odds FC, Bernaerts R. (1994). CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. J Clin Microbiol., Aug;32(8):1923-9.
- ²⁵ Ainscough S, Kibbler CC (1998). An evaluation of the cost-effectiveness of using CHROMagar for yeast identification in a routine microbiology laboratory. J Med Microbiol., Jul;47(7):623-8.
- ²⁶ Willemsen M, Breynaert J, Lauwers S. (1997). Comparison of Auxacolor with API 20 C Aux in yeast identification. Clin Microbiol Infect., Jun;3(3):369-375.
- ²⁷ Graf B, Adam T, Zill E, Gobel UB (2000). Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. J Clin Microbiol., May;38(5):1782-5.
- ²⁸ Kurtzman CP, Robnett CJ (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. J Clin Microbiol., May;35(5):1216-23.
- ²⁹ Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, Lefe K, Bui U, Limaye AP, Cookson BT. (2001). Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. J Clin Microbiol., Nov;39(11):4042-51.
- ³⁰ Rigby S, Procop GW, Haase G, Wilson D, Hall G, Kurtzman C, Oliveira K, Von Oy S, Hyldig-Nielsen JJ, Coull J, Stender H. (2002). Fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. J Clin Microbiol., Jun;40(6):2182-6.
- ³¹ Chen SC, Halliday CL, Meyer W (2002). A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. Med Mycol., Aug;40(4):333-57.
- ³² Vandebossche I, Vaneechoutte M, Vandevenne M, De Baere T, Verschraegen G (2002). Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth macrodilution method, E-test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. J Clin Microbiol., Mar;40(3):918-21.
- ³³ Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M (2002). Comparison of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing proposed standard and the E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility. J Clin Microbiol., Oct;40(10):3841-4.
- ³⁴ Sandven P, Bjorneklett A, Maeland A (1993). Susceptibilities of Norwegian *Candida albicans* strains to fluconazole: emergence of resistance. The Norwegian Yeast Study Group. Antimicrob Agents Chemother., Nov;37(11):2443-8.