

Strategimøte nr 22, 2008:

# Bakterielle infeksjoner i CNS

Hovedredaktører:

Jørgen Lassen

Per Sandven

Redaktører:

Ingvild Nordøy

Hanne Husom Haukland

Dag Harald Skutlaberg



**EKSTERNE KVALITETSVURDERINGER I BAKTERIOLOGI, MYKOLOGI OG  
PARASITTOLOGI**

**Rapport fra strategimøte**

**Hovedredaktører: Jørgen Lassen og Per Sandven**

Strategimøte nr 22, 2008

# **Bakterielle infeksjoner i CNS**

Redaktører:

**Ingvild Nordøy, Hanne Husom Haukland,  
Dag Harald Skutlaberg**

ISSN: 0804-8444



## **Forord**

Det 22. Strategimøte i regi av Referansegruppen for eksterne kvalitetsvurderinger i bakteriologi, mykologi og parasittologi omhandlet ”Bakterielle infeksjoner i CNS” og ble avholdt 07.11.2008 i Oslo. Det var første gang dette temaet ble behandlet på et strategimøte. I alt deltok 46 deltakere (én fra hver av de deltagende laboratorier) og observatører.

Ansvarlig programkomité, som også har ferdigstilt denne avsluttende rapporten, var Ingvild Nordøy (leder), Hanne Husum Haukland og Dag Harald Skutlaberg. Komitéen har som vanlig hatt et spesielt ansvar for den innledende og oppsummerende delen, mens ansvaret for de enkelte innleggene i rapportens del 2 er overlatt til de enkelte innleiderne.

De tallmessig hyppigste bakterielle CNS-infeksjoner, nemlig meningitter og hjerneabscesser vektlegges spesielt. Rapporten omhandler

- Prøvetaking, oppbevaring og transport
- Direkte mikroskopi
- Utsæd og dyrkningsbetingelser
- Antigenpåvisning og
- Bruk av genteknologiske metoder.

Vi håper rapporten vil vise seg å bli nyttig for de enkelte laboratoriene.

*Oslo, 4. mai 2009*

*For Referansegruppen*

*Jørgen Lassen*

*Per Sandven*



# INNHOLDSFORTEGNELSE

<i>Program for møtet</i> .....	6	
<i>Deltakere og observatører</i> .....	7	
<b>1</b>	<b>OPPSUMMERING</b> .....	<b>9</b>
1.1	MENINGITT OG HJERNEABSCESSESSER – KLINISKE ASPEKTER .....	9
1.2	PRØVETAKING, OPPBEVARING OG TRANSPORT (INKLUDERT HÅNDBLØTTING UTENOM LABORATORIETS ÅPNINGSTID) .....	11
1.3	DIREKTE MIKROSKOPI.....	13
1.4	UTSÆD OG DYRKNINGSBETINGELSER FOR ULIKE PRØVE-MATERIALER .....	13
1.5	ANTIGENPÅVISNING I CSV .....	15
1.6	BRUK AV GENTEKNOLOGISKE METODER VED INFEKSJONER MED BAKTERIER OG SOPP I SENTRALNERVESYSTEMET .....	16
<b>2</b>	<b>SAMMENDRAG AV INNLEGGENE</b> .....	<b>19</b>
2.1	MENINGITT OG HJERNEABSCESSESSER - KLINISKE ASPEKTER .....	19
2.2	PRØVETAKING, OPPBEVARING OG TRANSPORT .....	27
2.3	DIREKTE MIKROSKOPERING: INDIKASJON, AKTUELLE PRØVEMATERIALER OG METODER .....	32
2.4	UTSÆD OG DYRKNINGSBETINGELSER.....	37
2.5	ANTIGENPÅVISNING I CSV (EVT. OGSÅ URIN) - INDIKASJONER OG METODER.....	40
2.6	BRUK AV GENTEKNOLOGISKE METODER VED INFEKSJONER MED BAKTERIER OG SOPP I SENTRALNERVESYSTEMET .....	42
2.7	CNS-INFEKSJONER HOS DEN NEVROKIRURGISKE PASIENT. VURDERING AV FUNN – SIGNIFIKANTE ELLER IKKE?.....	51

## Program for møtet

<b>Tid</b>	<b>Tittel</b>	<b>Innleder</b>
1000-1010	Velkommen og introduksjon	Ingvild Nordøy Rikshospitalet
1010-1045	Kliniske aspekter	Steinar Skrede Medisinsk Avd., Haukeland Sykehus
1045-1115	Prøvetaking, oppbevaring og transport	Eivind Ragnhildstveit Mikrobiologisk avd., Sykehuset Østfold , Fredrikstad
1115-1135	Direkte mikroskopi	Einar Vik Molde sykehus, Helse Nordmøre og Romsdal HF
1135-1145	Pause	
1155-1225	Utsæd og dyrkningsbetingelser for ulike prøvematerialer	Andreas Emmert Sykehuset i Vestfold HF
1225-1325	Lunch	
1325-1355	Antigenpåvisning i CSV	Mette Walberg Sykehuset Asker og Bærum HF
1355-1425	Genteknologiske metoder	Fredrik Müller Rikshospitalet
1425-1510	CNS-infeksjoner hos den nevrokirurgiske pasient. Vurdering av funn – signifikante eller ikke?	Rune Hennig & Gunnar Skov Simonsen Universitetssykehuset i Nord- Norge
1510-1520	Oppsummering	Ingvild Nordøy Rikshospitalet



## Deltakere og observatører

Jan Egil Afset  
Mikrobiologisk avdeling  
St Olavs Hospital HF  
7030 Trondheim

Bjørn Brandsæter  
Bakteriologisk laboratorium,  
Aker universitetssykehus HF,  
0514 Oslo

Peter A, Csango  
Laboratorium for medisinsk  
mikrobiologi,  
Ålesund sjukehus,  
6026 Ålesund

Lumnije Dedi  
Mikrobiologisk avdeling,  
Ullevål universitetssykehus HF,  
0407 Oslo

Andreas Emmert  
Mikrobiologisk laboratorium,  
Sykehuset i Vestfold HF,  
3117 Tønsberg

Nina Evjen  
Mikrobiologisk avdeling,  
Akershus Universitetssykehus HF,  
1474 Nordbyhagen

Aasmund Fostervold  
Mikrobiologisk avdeling  
Akershus Universitetssykehus HF  
1474 Nordbyhagen

Peter Gaustad  
Mikrobiologisk institutt  
Rikshospitalet HF  
0027 Oslo

Carola Grub  
Mikrobiologisk avdeling,  
Ullevål universitetssykehus HF,  
0407 Oslo

Gorm Hansen  
Bakteriologisk laboratorium  
Aker universitetssykehus HF  
0514 Oslo

Hanne Husom Haukland  
Avd. for mikrobiologi og smittevern  
Universitetssykehuset Nord-Norge  
Postboks 56, 9038 Tromsø

Rune Hennig  
Nevrokirurgisk avdeling  
Universitetssykehuset Nord-Norge  
Postboks 64, 9038 Tromsø

Reidar Hide  
Laboratorium for medisinsk  
mikrobiologi,  
Ålesund sjukehus,  
6026 Ålesund

Reidar Hjetland  
Mikrobiologisk avdeling  
Helse Førde HF, Sentralsjukehuset  
6800 Førde

Mina Ø Høie  
Mikrobiologisk seksjon,  
Sentrallaboratoriet  
Sykehuset Asker og Bærum HF  
1306 Bærum postterminal

Alexandra Lakovlev  
Mikrobiologisk avdeling,  
St Olavs Hospital HF,  
7030 Trondheim

Pål A. Jenum  
Mikrobiologisk seksjon,  
Sentrallaboratoriet  
Sykehuset Asker og Bærum HF  
1306 Bærum postterminal

Bjørn Odd Johnsen  
Mikrobiologisk institutt  
Rikshospitalet HF  
0027 Oslo

Bjørn-Erik Kristiansen  
Unilabs Telelab  
P.b. 1868 Gulset,  
3703 Skien

Angela Keummel  
Laboratorium for medisinsk  
mikrobiologi  
Helse Nord-Trøndelag HF  
Sykehuset Levanger  
7600 Levanger

Astrid Lervik Larsen  
Mikrobiologisk avdeling  
Sykehuset Østfold HF, Fredrikstad  
1603 Fredrikstad

Jørgen Lassen  
Divisjon for smittevern  
Nasjonalt folkehelseinstitutt  
0401 Oslo

Jørn Åge Longva  
Mikrobiologisk laboratorium  
Helse Nordmøre og Romsdal HF  
6400 Molde

Iren Løhr  
Mikrobiologisk laboratorium  
Helse Stavanger HF  
4011 Stavanger

Turid Mannsåker  
Divisjon for smittevern  
Nasjonalt folkehelseinstitutt  
0401 Oslo

Anne Torunn Mengshoel  
Mikrobiologisk avdeling,  
Ullevål universitetssykehus HF,  
0407 Oslo

Liisa Mortensen  
Mikrobiologisk avdeling  
Nordlandssykehuset HF  
8092 Bodø

Fredrik Müller  
Mikrobiologisk institutt  
Rikshospitalet HF  
0027 Oslo

Haima Mylvaganam  
Avd. for mikrobiologi og immunologi,  
Helse Bergen HF,  
Haukeland Sykehus,  
5021 Bergen

Helge Myrmel  
Avd. for mikrobiologi og immunologi,  
Helse Bergen HF,  
Haukeland Sykehus,  
5021 Bergen

Ingvild Nordøy  
Mikrobiologisk institutt  
Rikshospitalet HF  
0027 Oslo

Paul Naaber  
Mikrobiologisk laboratorium  
Helse Stavanger HF  
4011 Stavanger

Annette Onken  
Mikrobiologisk seksjon,  
Sentrallaboratoriet  
Sykehuset Asker og Bærum HF  
1306 Bærum postterminal

Eivind Ragnhildstveit  
Mikrobiologisk avdeling  
Sykehuset Østfold HF, Fredrikstad  
1603 Fredrikstad

Rikard Rykkin  
Divisjon for smittevern  
Nasjonalt folkehelseinstitutt  
0401 Oslo

Helvi Holm Samdal  
Mikrobiologisk avdeling  
Sykehuset Buskerud HF  
3004 Drammen

Rolf-Arne Sandnes  
Avdeling for mikrobiologi,  
Sykehuset Innlandet HF Lillehammer,  
2629 Lillehammer

Gunnar Skov Simonsen  
Avd. for mikrobiologi og smittevern  
Universitetssykehuset Nord-Norge  
Postboks 56, 9038 Tromsø

Tone Skarpaas  
Enhet for medisinsk mikrobiologi  
Laboratorieavdelingen  
Sørlandet sykehus HF  
4604 Kristiansand S

Steinar Skrede  
Medisinsk avdeling,  
Helse Bergen HF,  
Haukeland Sykehus,  
5021 Bergen

Dag Harald Skutlaberg  
Avd. for mikrobiologi og immunologi  
Helse Bergen HF, Haukeland Sykehus  
5021 Bergen

Liv Jorunn Sønsteby  
Mikrobiologisk laboratorium  
Haugesund sykehus  
Postboks 2170  
5504 Haugesund

Einar Vik  
Mikrobiologisk laboratorium  
Helse Nordmøre og Romsdal HF  
6400 Molde

Inger Sofie Samdal Vik  
Divisjon for smittevern,  
Nasjonalt folkehelseinstitutt,  
0401 Oslo

Mette Walberg  
Mikrobiologisk seksjon,  
Sentrallaboratoriet  
Sykehuset Asker og Bærum HF  
1306 Bærum postterminal

Ingeborg Aaberge  
Divisjon for smittevern,  
Nasjonalt folkehelseinstitutt,  
0401 Oslo

# 1 OPPSUMMERING

## 1.1 Meningitt og hjerneabscesser – kliniske aspekter

Aktuelle bakterie- og sopp-infeksjoner i CNS er akutt og kronisk meningitt, encefalitt, myelitt, neuritt, hjerneabscess, subduralt empyem, epidural abscess og intrakraniell flebitt. Fremmedlegeme i CNS (shuntinfeksjoner er vanligst forekommende) kan være utgangspunkt for mer omfattende infeksjon. Når den laterale enden av shunten ligger i peritoneum er infeksjoner med anaerobe bakterier ikke uvanlig.

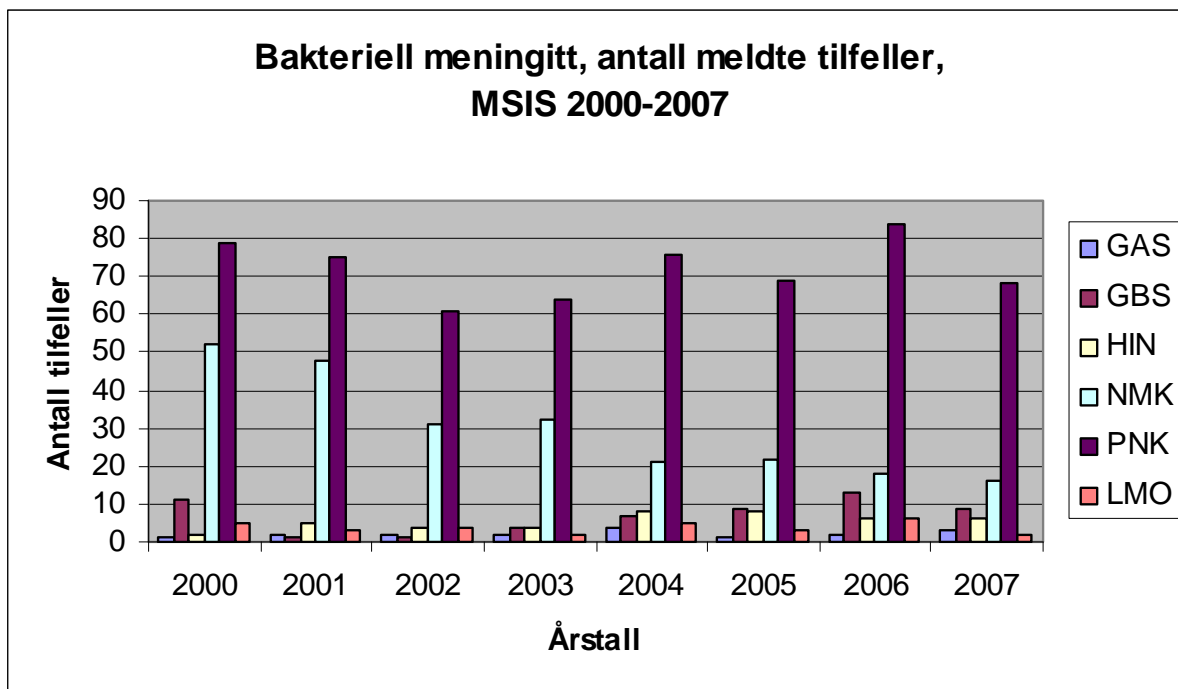
Bakterielle meningitter og hjerneabscesser utgjør tallmessig de hyppigste infeksjonene i CNS. Disse tilstandene vektlegges derfor.

### 1.1.1 Bakterielle meningitter

- Defineres som infeksjon i bindevevshinnene til hjernen – pia mater eller arachnoidea. Kan sekundært affisere omliggende vev.
- Tilstanden utvikler seg akutt eller subakutt, avhengig av vertsfaktorer og mikrobeegenskaper.
- Det er fra 2000 registrert mellom 103 og 150 tilfeller av bakteriell meningitt årlig i Norge.

De vanligst forekommende bakterier ved bakteriell meningitt er *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* og *S. pyogenes* (figur 1). Etter traume, nevrokirurgi og ved immunsuppresjon bør man også være oppmerksom på atypiske kliniske bilder og annen etiologi.

Figur 1.



GAS: Gruppe A streptokokker, GBS: Gruppe B streptokokker, HIN: *H.influenza*, NMK: *N. meningitidis*, PNK: *S. pneumoniae*, LMO: *L. monocytogenes*

### 1.1.2 Hjerneabscesser

- Er en avgrenset fokal eller multifokal infeksjon i hjerneparenchymet, oftest med primærfokus utenfor CNS: fra øvre luftveier, etter kirurgi, etter traume og ved hematogen spredning.
- Dette er ingen meldepliktig sykdom i Norge. Internasjonalt er forekomsten 0.3-1.3/100 000 innbyggere per år.
- Det er sammenheng mellom primært infeksjonsfokus, abscesslokalisasjon og etiologisk agens (tabell 1).
- 

**Tabell 1. Sannsynlig abscesslokalisasjon og mikrobefunn ved ulike primære infeksjonslokalisasjoner og i selekterte pasientgrupper.**

Det primære infeksjonsfokus	Sannsynlig abscesslokalisasjon	Vanligste bakteriologiske eller mykologiske funn
<b>Otogen</b>	Temporalt, cerebellart	Streptokokker, <i>Bacteroides</i> sp., <i>Prevotella</i> sp., <i>Enterobacteriaceae</i> ( <i>Proteus</i> ), <i>Pseudomonas</i> , <i>S. aureus</i>
<b>Bihuler paranasalt</b>	Frontalt (Sella turcica)	Streptokokker (milleri-gruppen), <i>Bacteroides</i> sp., <i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i>
<b>Odontogen</b>	Frontalt	Streptokokker, <i>Bacteroides</i> sp., <i>Fusobacterium</i> sp., <i>Prevotella</i> sp.
<b>Hematogen</b>	Multiple foci, tilfeldig	<i>S.aureus</i> , streptokokker (viridans gruppen)
<b>Lunger</b>	Multiple foci, tilfeldig	Stafylokokker, streptokokker, <i>Bacteroides</i> sp., <i>Enterobacteriaceae</i>
<b>Traume/nevrokirurgi</b>	Avhenger av fokus for barrierebrudd	<i>S. aureus</i> , koagulase-negative stafylokokker, streptokokker, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Clostridium</i> sp.
<b>Immunosuppresjon</b>	Multiple foci, tilfeldig	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Nocardia</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp. <i>Candida</i> sp., <i>C. neoformans</i> , <i>Aspergillus</i> sp.,

## 1.2 Prøvetaking, oppbevaring og transport (inkludert håndtering utenom laboratoriets åpningstid)

### 1.2.1 Prøvetaking, oppbevaring og transport av aktuelle prøvematerialer

Alle prøver bør om mulig tas før start av antibiotikabehandling.

#### Spinalvæske

a) *Prøvetakning:*

- 2-3 ml, minst 1-2 ml (minimum 4 dråper) tas så raskt som mulig på sterilt rør med skrukork, uten tilsetning.
- Blodkulturflasker (barneflasker), 1 aerob (og evt. 1 anaerob) flaske.  
Spinalvæske på blodkulturrør er spesielt viktig dersom pasienten har fått antibiotika før prøvetaking.

b) *Oppbevaring:* Spinalvæske til bakteriologisk dyrkning oppbevares ved romtemperatur dersom den ikke tas hånd om raskt. Til andre undersøkelser (for eksempel PCR) bør prøven oppbevares kaldt (4°C eller - 20°C).

#### Abscessmateriale / aspirat / puss / irrigasjonsvæske

a) *Prøvetakning:* Aspireres i steril sprøyte som forsegles før transport. Store volum om mulig, prøverør fylles helt. Noe bør settes på anaerobt transportmedium om mulig. Rask transport til laboratoriet.

Om nok materiale, bør det settes på blodkulturflasker – aerob og anaerob.

b) *Oppbevaring:* Dersom prøven må oppbevares før utsæd, bør prøven oppbevares i kjøleskap. Prøve som er sådd ut på dyrkningsmedium settes ved romtemperatur inntil transport til laboratoriet.

#### Materiale ved mistenkt shuntinfeksjon

a) *Prøvetakning:* 4-5 cm av distale kateterdel klippes av og settes i sterilt prøverør.

Evt. nåleaspirasjon (1-2 ml) fra shuntreservoar.

Evt. spinalvæske tatt ved spinalpunksjon.

Evt. sårsekret rundt shunt.

Send materialet snarest mulig til laboratoriet.

Blodkultur

b) *Oppbevaring:* Dersom det må oppbevares, gjøres det i kjøleskap.

#### Biopsi / vevsprøver

a) *Prøvetakning:* Utføres av nevrokirurg, som avtaler med laboratoriet på forhånd.

Sterilt rør, ev. tilsatt saltvann, rask transport.

b) *Oppbevaring:* Oppbevares i romtemperatur før transport.

#### Blodkultur

Alltid indisert ved diagnostikk av systemisk infeksjon og alltid ved mistanke om bakteriell meningitt. 2-3 blodkultursett pr 24 timers periode..

## **Andre aktuelle prøvematerialer**

### ***Urin***

Kan være aktuelt for antigenesting (herunder *S. pneumoniae*).

### ***Serum***

Evt nullprøve og ny prøve etter 1-2 uker ved aktuell problemstilling.

Ved bestemmelse av intratekal antistoffproduksjon skal serum sendes parallelt med spinalvæske.

### ***Nasopharynxprøve, halsprøve, evt øreprøve***

Kan være aktuelt ved CNS-infeksjon i forbindelse med luftveisinfeksjon.

Kan også være aktuelt ved utbruddsoppklaring eller hvis pasienten har fått antibiotika før spinalpunksjon.,

### ***Blemmeinnhold, hudlesjoner, petekkier***

Evt aspirat på transportmedium (Stuart el. lign.).

(Aspirat fra petekkier er omdiskutert)

### ***Leddvæske, pleuravæske, pericardvæske***

Ved spørsmål om septiske metastaser.

### ***Obduksjonsmateriale***

a) *Prøvetaking*: Steril teknikk. Sterile prøveglass. Aktuelle prøvematerialer: Hjerteblod, spinalvæske, evt. cyste- og abscessinnhold. (Formalin må unngås!)

b) *Oppbevaring*: Oppbevares i kjøleskap – ved mistanke om anaerober ved romtemperatur.

## **Transport**

Alle prøvematerialer må transporteres raskest mulig til laboratoriet. Spinalvæsker bør såes ut innen 2-4 timer. Dersom det er mistanke om anaerober, for eksempel abscessmateriale, innen 1 time.

### **1.2.2 Håndtering utenom laboratoriets åpningstid**

#### ***Spinalvæske:***

- Dersom det ikke er mulig å sende prøven til laboratoriet straks (innen 2 – 4 timer), anbefales direkte utsæd på blod og sjokoladeagar, evt. også på aerob blodkulturflaske, umiddelbart etter prøvetaking.
- Utførelse: Det dryppes 4-5 dråper sp.v. direkte på blod- og sjokolade-skål, evt. tilsettes også 0,5 ml.sp.v. til aerob barneblodkulturflaske.
- Skålene, evt. også blodkulturflasken, inkuberes ved 35 – 37 °C, om mulig i CO<sub>2</sub> atmosfære.
- Det bør lages 2 utstrykspreparater til mikroskopi. Et preparat kan Gram farges på stedet. Det andre sendes laboratoriet. Påse at preparatet er tørket før det pakkes for sending.
- Det en fordel også å sende noen dråper spinalvæske dryppet på en pensel som settes i transportmedium.
- Aktuelle avdelinger og ”perifere” sykehus bør ha medier til bruk utenom laboratoriets åpningstid og ved lang forsendelse.

- Transport: Prøvemateriale, skåler og preparat sendes til det mikrobiologiske laboratorium så snart som mulig. Regler for transport av biologisk materiale må følges.

### 1.3 Direkte mikroskopi

#### Indikasjon og prøvemateriale:

- Mistanke om meningitt (spinalvæske).
- Mistanke om andre bakterie-/ soppinfeksjoner i CNS (aspirat frå abscesser og shunt-reservoar, puss frå operasjon, biopsier).

#### Sentrifugering:

- Klar spinalvæske bør konsentrerast ved sentrifugering så sant det føreligg nok materiale (> 0.5 ml). Sentrifugering direkte på objektglas (cytospin) gir høgare sensitivitet jamført med konvensjonell sentrifugering.
- Blakka spinalvæske eller små mengder (<0,5 ml) bør ikkje sentrifugerast.

#### Tillaging:

- *Blank væske*: la nokre dråper tørke på objektglaset
- *Blakka væske*: dra utover og la lufttørke. Etterstreb ett cellelag
- *Biopsi*: avtrykk av frisk flate på objektglass, mortre, spre.

Flammefikseres

#### Fargemetoder

Ved tilgang til fluorescens-mikroskop, blir farging med acridinorange (AO) tilrådd som primær fargemetode. Eventuelt bruk av andre fargemetoder er avhengig av funn i AO-preparat:

- Ingen ytterlegare mikroskopi-analyser ved negativt funn i AO-preparat.
- Gram-farging dersom AO-preparat gir mistanke om bakterier
- Calcofluor white-farging eller eventuelt tusj/ nigrosinfarga våtpreparat dersom AO-preparat gir mistanke om sopp.

Dersom fluorescens-mikroskop ikkje er tilgjengelig, bør gram-farging vera primærmetoden. Calcofluor white-farging eller eventuelt tusj/ nigrosinfarga våtpreparat dersom det er klinisk mistanke om sopp, eller dersom AO- eller gram-preparat gir mistanke om sopp.

### 1.4 Utsæd og dyrkningsbetingelser for ulike prøvematerialer

Utsæd og dyrkningsbetingelser ved infeksjoner i CNS vil variere noe avhengig av hva man mistenker, basert på vert og klinikk. I tabellen under er det gjort et forsøk på å gi en generell anbefaling. Ved bakteriell meningitt trenger man i utgangspunktet ikke alltid å så ut cerebrospinalvæske (CSV) anaerobt, men bare når det foreligger mistanke om anaerob etiologi (herunder hvis infeksjonen har utgangspunkt i masteoditt eller kronisk sinusitt, og ved hjerneabscess, subduralt empyem, epidural abscess, postoperativ infeksjon og shuntinfeksjon). Fordi man på laboratoriet ikke nødvendigvis har full oversikt over klinikken, kan man derfor vurdere om ikke all CSV primært også bør sås ut anaerobt.

Dersom man har mye materiale (CSV eller puss), vil det være verdifullt å sette dette på blodkulturbuljong supplert med vekstfaktorer.

Anbefaling om inkubasjonstider varierer med forfatter. Variasjoner i tid gjelder spesielt ved dyrkning av sopp i puss fra hjerneabscess. Klare anbefalinger er vanskelig å gi. Man bør eventuelt vurdere andre metoder i tillegg til dyrkning for påvisning av sopp.

## UTSÆD ved CNS infeksjoner

Materiale og klinikk	Medier	Inkubasjon			Avlesning
		Temp (°C)	Atm	Tid	
<b>Cerebrospinal væske</b> Alltid ved mistanke om infeksjon utsæd på følgende måte:	Sjokolade	35-37	5 % CO <sub>2</sub>	2-4 d	Daglig
	Blod	35-37	5 % CO <sub>2</sub>	2-4 d	Daglig
	evnt. på blodkultur-medium*	35-37	Aerob Anaerob	5-7 d	Automatisert
<i>Tillegg ved:</i> Shunt infeksjon Postoperativt  Mastoiditt Sinusitt Otitt  Hjerneabscess Epidural abscess Empyem	FAA + KV	35-37	Anaerob	5 d	Dag 3 og 5
<i>Tillegg ved:</i> Shunt infeksjon	Buljong*	35-37	Aerob	7-10 d	1 d etter utsæd
<i>Tillegg ved:</i> Immunsvikt	Selektiv soppskål	30 og 37	5 % CO <sub>2</sub>	5-21 d	Daglig



Materiale og klinikk	Medier	Inkubasjon			Avlesning
		Temp (°C)	Atm	Tid	
<b>Kateter/Shunt</b>	Kateter/Shunt i buljong	35-37	Aerob	5-7 d	1 d etter utsæd
<b>Abscess/Vev</b>	Sjokolade**	35-37	5 % CO <sub>2</sub>	2-4 d	Daglig
	Blod	35-37	5 % CO <sub>2</sub>	2-4 d	Daglig
	evnt. på blodkultur medium*	35-37	Aerob Anaerob	5-7 d	Automatisert
	FAA + KV skål	35-37	Anaerob	5 d	Dag 3 og 5
	Buljong for Actinomyces dyrkning	35-37	Anaerob	12 d	Utsæd etter 7 dager: avlesning etter 3 d og 5 d.
<i>Tillegg ved:</i> Immkompr. pasient DM m/ketoacidose Brannskade Traume IVDU Amøbiasis	Selektiv soppeskål	30 og 37	5 % CO <sub>2</sub>	5-30 d	Daglig
	Buljong	35-37	Aerob	7-10 d	1 d etter utsæd
	BCYE (Nocardia)	35-37	Fuktet aerob	14 d	Daglig

\* med tilsats: vitalex eller FOS

\*\* utsæd på flere typer selektive skåler om nok materiale (laktose, manitol-salt, selektiv soppeskål)

FAA: Blodagar som inneholder glucose, hemin og menadion (vit. K).

KV: Blodagar som inneholder glucose, hemin, menadion, kanamycin og vancomycin.

BCYE: agar med "buffered charcoal yeast extract"

## 1.5 Antigenpåvisning i CSV

Det finnes latex agglutinasjonsteknikker mot følgende bakteirelle agens:

*H. influenzae* type B, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *E. coli* K1 og streptokokker gr. B samt mot soppen *C. neoformans*.

Pneumokokkantigentesten (samme som vanligvis brukes i urin) har høy sensitivitet (95.4 %) og spesifisitet (100 %) i spinalvæske ved pneumokokkmeningitt.

(Use of the NOW Streptococcus pneumoniae urinary antigen test in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of pneumococcal meningitis. Samra Z, Shmueli H, Nahum E, Paghis D, Ben-Ari J. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45(4):237-40)

Bakterieantigentest med latex agglutinasjonsteknikk har for øvrig lav sensitivitet og spesifisitet og anbefales ikke brukt. Ved klinisk mistanke om bakteriell meningitt og negativt dyrkningsresultat anbefales eventuelt undersøkelse med genteknologiske metoder (f eks PCR).

### Kryptokokkantigen

Ved mistanke om kryptokokkmeningitt er kryptokokkantigentest i spinalvæske et viktig tillegg til mikroskopi med calcofluor white eller nigrosin/tusj/indian ink og dyrkning.

Det anbefales at det samtidig også tas serumprøve til kryptokokkantigentest.

Hos AIDS pasienter er også urin egnet for påvisning av kryptokokkantigen.

## 1.6 Bruk av genteknologiske metoder ved infeksjoner med bakterier og sopp i sentralnervesystemet

### Indikasjon for bruk

- Påvisning og identifikasjon av mikrober i dyrknings-negative prøver (spinalvæsker, puss, biopsier, shuntspisser) der det er sterk klinisk mistanke om infeksjon og/eller der det er sett mikrober ved direkte mikroskopi av prøvematerialet. Det kan også gjelde pasienter som har fått antibiotika forut for prøvetakingen  
Dette kan inkludere påvisning av resistensgener og/ eller virulensgener, samt molekylær typing av påviste mikrober
- Rask påvisning og identifikasjon av etiologisk agens ved klinisk mistanke om meningitt.
- Kan vurderes som rutinediagnostikk ved abscesser i CNS (i tillegg til dyrkning).

### Prøvemateriale, prøvetaking og transport.

Viktige prøvematerialer er spinalvæske, puss, biopsier og shuntspisser. Prøvetaking skjer som ved øvrig mikrobiologisk diagnostikk, transport bør skje nedkjølt eller frosset dersom transporten > 24 timer.

Materialet bør ikke være formalinfiksert (men det finnes ekstraksjonsprotokoller også for slikt materiale)

### Ekstraksjon av nukleinsyre

Kvaliteten på ekstraksjon er avgjørende for kvaliteten på det endelige analyseresultatet og det er derfor viktig at metodene som benyttes blir validert av det enkelte laboratorium. I den sammenhengen må det legges vekt på metodens egenskaper med hensyn til å:

- frigjøre nukleinsyre fra mikroorganismen
- unngå degradering av nukleinsyren
- fjerne inhiberende substanser
- konsentrere nukleinsyren i materialet

Det er en fordel om metoden kan automatiseres.

### Metoder

PCR er den genteknologiske metoden som har fått størst anvendelse innen mikrobiologisk diagnostikk. Metodikken kan benyttes på ulike måter:

- Ved å bruke primere som binder seg til artsspesifikke gen-sekvenser, kan man påvise og identifisere mikrober i samme reaksjon, men man får kun svar på om den (de) aktuelle mikroben(e) er tilstede eller ikke (levende eller døde).  
Det er publisert en rekke primere til påvisning av mikrober som er aktuelle ved infeksjoner i CNS.
- Ved å bruke primere som binder seg til konserverte, universelle gensekvenser som flankerer variable, artsspesifikke gensekvenser, kan man i første omgang undersøke **om** det foreligger mikrobielt DNA i prøvematerialet. Ved positiv PCR-reaksjon kan mikroben som foreligger i prøvematerialet identifiseres ved å sekvensere det amplifiserte genproduktet.  
Eksempler på gener som kan benyttes på denne måten er 16S rDNA og ITS (Internal transcribed spacer) hos bakterier og 18S rDNA og ITS hos sopp.

Sanntids-PCR blir stadig mer vanlig innen mikrobiologisk diagnostikk. Fordelene er bl.a. at svaret foreligger etter kort tid (ca. 1 time ekskl. tid til ekstraksjon) og at det er lav risiko for forurensing. Bruk av spesifikke prober øker også spesifisiteten sammenlignet med konvensjonell PCR.

Det finnes andre genteknologiske metoder som kan være aktuelle ved diagnostikk av infeksjoner i CNS, men disse blir brukt i mindre omfang enn PCR.

### **Hva bør gjøres hvor?**

På det enkelte laboratorium gjøres det som er mulig ut fra tilgjengelig kompetanse og instrumentering.

Ut over dette foreslås følgende som et minimum for hva som bør være tilgjengelig på de ulike nivåene:

#### *Regionalt nivå:*

- Genteknologiske metoder for påvisning av alle vanlige ”meningitt-agens”
- 16S rDNA PCR/ sekvensering (eller tilsvarende) for påvisning og identifikasjon av bakterier

#### *Nasjonalt nivå (referanselaboratorier):*

- Genteknologiske metoder for påvisning av uvanlige agens/ agens hos immunsupprimerte
- 18S rDNA PCR/ sekvensering (eller tilsvarende) for påvisning og identifikasjon av sopp
- Typingsmetoder, inkludert metoder for typing av viktige ”meningitt-agens”
- Påvisning av resistensgener hos viktige ”meningitt-agens”



## 2 SAMMENDRAG AV INNLEGGENE

### 2.1 Meningitt og hjerneabscesser - kliniske aspekter

*Steinar Skrede, Medisinsk avdeling, Haukeland sykehus*

#### Meningitt

##### Definisjoner

Anatomisk definert begrenses infeksjonen akutt bakteriell meningitt, hjernehinnebetennelse, til infeksjon i bindevevshinnene til hjernen. Infeksjonen er lokalisert til årehinnen, pia mater, eller spindelvevshinnen, arachnoidea. Infeksjon kan også sekundært affisere kortikale og subkortikale strukturer og hjernenerver. Klinisk definert er akutt bakteriell meningitt en tilstand som utvikler seg over timer til få dager, avhengig av vertsfaktorer som alder og immunstatus, samt av egenskapene til mikroben som forårsaker infeksjonen. Klassiske symptomer hos voksne er feber, hodepine, endret mental status, med eller uten nakkestivhet, lysskyhet, og fokale nevrologiske tegn (1). Petekkier ses hos omtrent  $\frac{3}{4}$  av pasienter med meningokokkmeningitt (2), mens hos pasienter med meningitt og petekkier er meningokokker den bakterielle årsaken i 99% av tilfellene (1). Kliniske tegn på meningitt hos voksne (Kernigs tegn og Brudzinskis tegn) har ved dagens sykdomspresentasjon meget lav sensitivitet (5%) (3). Klassisk triade (feber, nakkestivhet, nedsatt sensorium) ses nå hos mindre enn halvparten av voksne pasienter med meningitt (1). De historiske kliniske definisjonene er derfor mindre egnet i dag enn tidligere (1,3). Barn i alderen 1 til 4 år har oftest symptomene feber (94%) og oppkast (82%) og ved undersøkelse har 77% nakkestivhet (4).

##### Epidemiologi

Hjernehinnebetennelse har for tiden lav insidens i Norge. Det foreligger per i dag ingen nominativ meldeplikt for syndromet akutt bakteriell meningitt, så insidenstillene er kun veiledende. Forekomsten presentert her er beregnet på grunnlag av klinisk meldte syndromer for mikrobepesifikke, meldepliktige invasive sykdommer, registrert ved Folkehelseinstituttet.

Forekomsten av meningitt i Norge har langvarig vært stabilt fallende. Siden 2000 er det årlig registrert mellom 103 og 150 tilfeller av meningitt. Dette gir et laveste overslag av insidens på 2 til 3/100.000 innbyggere/år. Det laveste antallet meldte tilfeller var i 2007, det høyeste i 2000 ([www.msis.no](http://www.msis.no), Øistein Løvold, personlig meddelelse). Mens det største absoluttallet av meningitttilfeller tidligere var blant pasienter yngre enn 20 år, er forholdene i dag forandret. Omtrent  $\frac{2}{3}$  ses hos voksne pasienter eldre enn 20 år. Meningitt epidemiologien har forandret seg raskt, så det er av stor betydning for klinikere tidlig å være oppmerksom på forandringer av forekomst også i tiden som kommer.

##### Pneumokokker.

Insidensen av invasiv pneumokokksykdom i Norge har vært stabilt økende frem til ca 2005, men den er nå noe fallende. På tross av introduksjon av vaksiner, har man ennå ikke registrert sikkert fallende forekomst av bakteriell meningitt forårsaket av pneumokokker her i landet. Funn i områder der 7-valent vaksine har vært lenger i bruk enn her tilsier at dette kan endre seg for både all invasiv sykdom og meningitt i løpet av begrenset tid (5,6). De siste 8 årene har det i Norge blitt meldt mellom 61 (2002) og 84 (2006) tilfeller av

meningitt (figur 1). Kategoriene ”meningitt” og ”meningitt og sepsis” utgjør vel 7% av alle meldte tilfeller av alle invasive pneumokokktilfeller. Blant de 577 meldte tilfellene av meningitt i tidsrommet 2000 til 2007, er 149 tilfeller meldt som klinisk meningitt og sepsis (25%). Det er i aldergruppen 0-9 år og 50-70 år at man har registrert de høyest absolutte antall tilfeller av pneumokokkmeningitt. Forekomsten av de pediatriske tilfellen var i det aktuelle tidsrommet høyest i 2005 (tyve) og lavest i 2007 (ni) og 2000 (åtte). I den voksne befolkningen har det heller ikke vært observert sikre forandringer i forekomst i dette tidsrommet. Pneumokokkmeningitt kjennetegnes klinisk av at nær 2/3 av pasientene har ekstrameningealt infeksjonsfokus, og bakteriemi er hyppig (1). Mortaliteten er omtrent 20% (16-37) og høyest blant de eldre middelaldrende og gamle pasientene (7,8).

### **Meningokokker.**

Forekomsten av meningokokkmeningitt er fremdeles fallende, med færre registrerte tilfeller år for år. I tidsrommet 2000 til 2007 har antallet meldte tilfeller falt fra 52 til 16. Det er meldt sykdomstilfeller for alle aldersgrupper i denne tiden. Fremdeles er de fleste tilfellene blant barn og ungdom (35% siste 3 år), selv om absoluttallene har blitt svært lave i disse årene. Flere tilfeller enn tidligere meldes som meningitt og sepsis, som nå utgjør 50% av tilfellene. Antallet pasienter med serogruppe B har vært sterkest fallende. Mortaliteten er høyere enn tidligere (omtrent 15%), men variabel.

### **Haemophilus influenzae.**

Etter introduksjonen av Haemophilus influenzae type b vaksine i barnevaksinasjonsprogrammet er Haemophilusmeningitt, som før var en ledende årsak til akutt bakteriell meningitt blant pediatriske pasienter, blitt svært sjelden. Det er meldt sykdomstilfeller for alle aldersgrupper i denne tiden. Fremdeles er de fleste tilfellene blant barn og ungdom i alder 0-19 år (33% siste 8 år), selv om absoluttallene har blitt svært lave i disse årene. Forekomsten av meldte tilfeller har variert fra 2 til 8 årlig. Andre serotyper enn b ses.

### **Gruppe B streptokokker.**

Meningitt forårsaket av gruppe B streptokokker (GBS) er sjelden. Først og fremst er det en pediatrisk tilstand (75% av tilfellene i tiden 2000-2007). Det forekommer tilfeller i andre aldersgrupper sporadisk. Meningitt med sepsis er en større gruppe enn meningitt, nær 60 % av alle tilfellene er klassifisert slik klinisk. Av all invasiv GBS sykdom i Norge utgjør meningitt omtrent 5%.

### **Listeria monocytogenes.**

Meningitt forårsaket av Listeria monocytogenes er sjelden. Det meldes 2 til 6 tilfeller årlig i Norge. Av dem med meningitt har et mindretall sepsis (20%). Blant meldte tilfeller er det nesten ingen pediatriske tilfeller de siste 8 årene. Omtrent 70% av pasientene har vært eldre enn 60 år gamle.

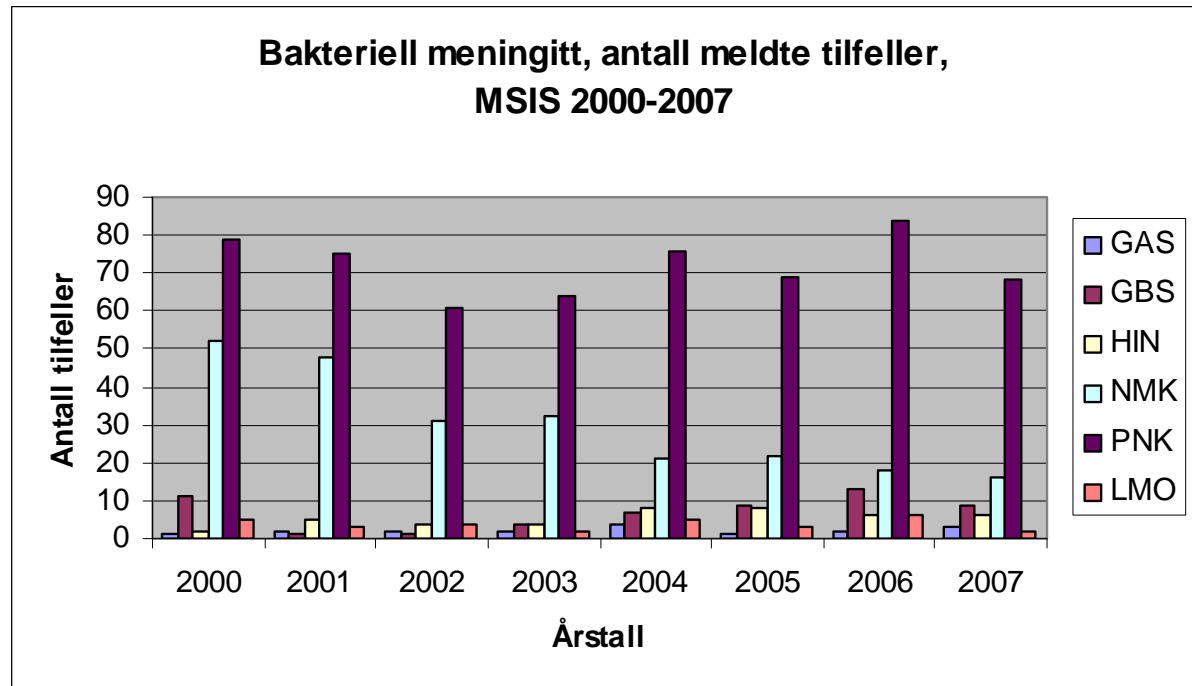
### **Gruppe A streptokokker.**

Forekomsten av invasiv gruppe A streptokokksykdom (GAS) har i en rekke år vært stabilt høy i Norge, med maksimal innsidens på 5,8/100.000/år i 1998 (9). I Norge er andelen av meningitttilfeller blant alle tilfeller av invasiv GAS meget lav, bare 1,1% i tidsrommet 2000-2007. Det er sammenlignbart med situasjonen i andre land, der forekomsten er <1-3% av alle invasive tilfeller (10-13). Tilsvarende utgjør GAS meningitt <2% av alle meningitttilfeller i Norge. I andre land er denne andelen helt sammenlignbar, 0,3-2%

(1,14,15). Større epidemiologiske undersøkelser av GAS meningitt foreligger ikke. I to større materialer er mortaliteten blant pasienter i Nederland 27% og i USA 37,5% (15,16). På samme måte som for pasienter med pneumokokkmeningitt, har de med GAS meningitt oftest ekstrameningealt infeksjonsfokus, hyppigst i øvre luftveier (15, egne upubliserte data). Bakteriemi er også vanlig forekommende ved denne sjeldne meningittformen.

### Andre bakterielle meningitter.

Forekomsten av sporadiske, sjelden forekommende meningitter og postoperative meningitter er dårlig kartlagt.



Figur 1. Antall tilfeller av akutt bakteriell meningitt meldt msis i tidsrommet 2000-2007. Forkortelser: GAS gruppe A streptokokker, GBS gruppe B streptokokker, HIN Haemophilus influenzae, MNK meningokokker, PNK pneumokokker, LMO Listeria monocytogenes

### 1. Vertsfaktorer, pasientgrupper

#### Nyfødte.

Komplikasjoner ved fødsel som for eksempel prematur fødsel, tidlig fostervannsavgang eller infeksjon av amnionvæske disponere for meningitt med GBS, *Enterobacteriaceae* (E.coli K1, andre species), eller Listeria. Svært få tilfeller av sistnevnte er meldt i Norge.

#### Barn 1 måned-2 år.

I denne gruppen ses hyppigst pneumokokker og meningokokker. Sjeldnere årsaker i denne gruppen er GBS, *Enterobacteriaceae*, GAS og Haemophilus influenzae.

#### Barn 2år – voksne 50 år.

Hyppigst ses pneumokokk- og meningokokkmeningitt. Postoperative meningitter med ulike mikrobielle agens ses særlig hos voksne.

**Voksne > (50) 60 år.**

I denne gruppen er pneumokokkmeningitt hyppigst, men tilfeller av meningokokker forekommer. Det er særlig i denne pasientgruppen at man finner tilfellene med *Listeria* meningitt. GBS meningitt forekommer også i denne aldersgruppen.

**Hodetraume.**

Hodetraumepasienter løper risiko for å utvikle bakteriell meningitt sekundært til skaden. Ved penetrerende traumer er *Staphylococcus aureus*, koagulase negative stafylokokker, eller Gram negative stavbakterier aktuelle agens, mens ved Basis cranii frakturer ses oftest luftveispatogene arter som pneumokokker, *Haemophilus influenzae* og GAS.

**Nevrokirurgiske pasienter.**

Data fra Haukeland Universitetssjukehus tyder på at kanskje mer enn 1/4 av alle pasienter med kliniske meningitt med positiv dyrkning av spinalvæske ses blant pasienter som har gjennomgått nevrokirurgiske prosedyrer (egne data, ikke publisert). I denne gruppen finner vi tilfeller med *Staphylococcus aureus*, koagulase negative stafylokokker, Gram negative intestinale stavbakterier og fattigforgjærende Gram negative intestinale stavbakterier, ikke ulikt det rapportert fra Nederland (18).

**Immunosupprimerte.**

Pasienter med medikamentelt betinget immunsuppresjon, så vel som de med defekter i humoral/cellulær immunitet, har meningitter som oftest er forårsaket av pneumokokker og meningokokker. Likevel er sjeldnere årsaker til meningitt som *Listeria*, Gram negative intestinale stavbakterier inkludert fattigforgjærende arter, mer aktuelle i denne spesielle pasientgruppen (19).

**Litteratur:**

1. van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB and Vermeulen M. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2004;351:1849-59.
2. Anderson J, Backer V, Voldsgaard P, et al. Acute meningococcal meningitis: analysis of features of the disease according to the age of 255 patients. *J Infect* 1997;34:227-35.
3. Thomas K, Hasbun R, Jekel J and Quagliarello J. The diagnostic accuracy of Kernig's sign, Brudzinski's sign, and nuchal rigidity in adults with suspected meningitis. *Clin Infect Dis* 2002;35:46-52.
4. Ashwal S, Perkin RM, Thompson JR et al. Bacterial meningitis in children: current concepts of neurologic management. *Curr Probl Pediatr* 1994;24:267-84.
5. Albrich, W.C., Baughman W., Schmotzer B and Farley M.M. Changing characteristics of invasive pneumococcal disease in metropolitan Atlanta, Georgia, after introduction of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis* 2007;44:1569-76
6. Pletz MW, Maus U, Krug N, Welte T and Lode H. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaptation to the species. *Int J Antimicrob Agents* 2008;doi:10.1016/j.jantimicag.2008.01.021
7. Weisfelt M, de Gans J, van der Poll T and van de Beek D. Pneumococcal meningitis in adults: new approaches to management and prevention. *Lancet Neurol* 2006;5:332-42.
8. Weisfelt M, van de Beek D, Spanjaard L, Reitsma JB and de Gans J. A risk score for unfavourable outcome in adults with bacterial meningitis. *Ann Neurol* 2008;63:90-7.



9. Meisal R, Høiby EA, Aaberge IS and Caugant D. Sequence type and *emm*-type diversity in *Streptococcus pyogenes* isolates causing invasive disease in Norway between 1988 and 2003. *J Clin Microbiol*. 2008;doi:10.1128/JCM.00363-08
10. Eriksson BKG, Andersson J, Holm SE and Norgren M. Epidemiological and clinical aspects of invasive group A streptococcal infections and the streptococcal toxic shock syndrome. *Clin Infect Dis* 1998;27:1428-36.
11. Luca-Harari B, Ekelund K, van der Linden M, Staum-Kaltoft M, Hammerum AM and Jasir A. Clinical and epidemiological aspects of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in Denmark during 2003 and 2004. *J Clin Microbiol* 2008;46:79-86.
12. Lamagni TL, Neal S, Keshishian C, Alhaddad N, George R, Duckworth G, et al. Severe *Streptococcus pyogenes* infections, United Kingdom 2003-2004. *Emerg Infect Dis* 2008;14:202-9.
13. Lamagni TL, Darenberg J, Luca-Harari B, Siljander T, Efstratiou A, Henriques-Normark B, et al. The epidemiology of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. *J Clin Microbiol* doi:10.1128/JCM.00422-08.
14. Møller K, Fredriksen EH, Wandall JH and Skinhøj P. Meningitis caused by streptococci other than *Streptococcus pneumoniae*: a retrospective clinical study. *Scand J Infect Dis* 1999;31:375-81.
15. van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Sela S, Vermeulen M and Dankert J. Group A streptococcal meningitis in adults: report of 41 cases and a review of the literature. *Clin Infect Dis* 2002;34:e32-6.
16. O'Loughlin RE, Roberson A, Cieslak PR, Lynfield R, Gershman K, Craig A et al. The epidemiology of invasive group A streptococcal infection and potential vaccine implications: United States, 2002-2004. *Clin Infect Dis* 2007;45:853-62.
17. Meyer CN, Schønheyder HC, Bangsborg J, Nielsen XC, Møller JK, Mølbak K, et al. Bakteriell meningitis i Danmark 2002 og 2003. *Ugeskr Læger* 2007;169:503-6.
18. Weisfelt M, van de Beek D, Spanjaard L and de Gans J. Nosocomial bacterial meningitis in adults: a prospective series of 50 cases. *J Hospital Infect* 2007;66:71-8.
19. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos K, Scheld M, et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 2004;39:1267-84.
20. Weisfelt M, van de Beek D, Spanjaard L, Reitsma JB, and de Gans J. Community acquired bacterial meningitis in older people. *J Am Geriatr Soc* 2006;54:1500-7.
21. Proulx N, Frechette D, Toye B, Chan J and Kravcik S. Delays in the administration of antibiotics are associated with mortality from adult acute bacterial meningitis. *Q J Med* 2005;98:291-8.
22. Spanos A, Harell FE, and Durack DT. Differential diagnosis of acute meningitis. An analysis of the predictive value of initial observations. *JAMA* 1989;262:2700-7.

## Hjerneabscess

### Definisjoner

Hjerneabscess er en avgrenset fokal eller multifokal infeksjon i hjerneparenchymet, forårsaket av bakterier, sopp eller protozoa. Tilstanden begynner som fokal cerebritt og utvikler seg over et par uker til et velavgrenset kapselkledd, pussfylt hulrom omgitt av ødem. De fleste pasienter har et primært infeksjonsfokus utenfor sentralnervesystemet. Infeksjonen opptrer prinsipielt på tre forskjellige måter; 1. den oppstår sekundært etter lokal bakteriell invasjon fra en infeksjon i nærliggende strukturer, vanligvis øvre luftveier, 2. den kommer etter hodetraume eller nevrokirurgisk prosedyre, eller 3. den kommer ved hematogen spredning, hyppigst fra lungeinfeksjoner eller ved endokarditt.

## **Epidemiologi**

Det foreligger ingen nominativ meldeplikt for sykdommen i Norge. Forekomsten av hjerneabscess internasjonalt er 0,3-1,3/100.000 innbyggere/år. Det diagnostiseres trolig omtrent 30-60 pasienter med hjerneabscess i Norge hvert år. Omtrent 2/3 av pasientene er menn. Haukeland Universitetssjukehus (HUS) har regionspsykehusfunksjon med nevrokirurgisk behandlingskompetanse for 1,1 millioner mennesker. Det behandles nå omtrent 10-12 pasienter med hjerneabscess årlig ved HUS og antallet er stigende. Sikre tall foreligger ikke, men er under utarbeidelse. De siste ti årene synes forekomsten å være omtrent doblet.

## **Vertsfaktorer, pasientgrupper**

### **Primærfokus i øvre luftveier.**

Internasjonalt ses hjerneabscess i omtrent 2/3 av tilfellene sekundært til øvre luftveisinfeksjon som akutt og kronisk mellomørebetennelse, eller mastoiditt. Ved otogent oppstått infeksjon ses vanligvis solitær hjerneabscess. Denne er med størst sannsynlighet lokalisert til temporallappen, men cerebellart fokus er også mulig. Omvendt er cerebellare abscesser vanligvis sekundære til otogene infeksjoner. Hjerneabscess oppstått sekundært til sinusitt rammer nesten alltid frontallappene. Sinus frontalis og ethmoidalis er hyppigst primærfokus, dette til tross for at ethmoidalsinusitt er en sjelden sykdom. Tilfeller sekundært til sinusitis maxillaris forekommer også. Tilstanden ses hyppigst hos unge voksne og oftere hos menn enn kvinner.

### **Primærfokus i munnhule.**

Sett i forhold til forekomsten av tanninfeksjoner er komplikasjonen hjerneabscess sjelden. Odontogent fokus blir bekreftet i få tilfeller, men på bakgrunn av mikrobiologiske funn og fordi forbigående bakteriemi er så hyppige etter tannstell og kirurgiske prosedyrer i munnhulen, er det antatt at odontogent fokus er mest sannsynlig årsak til de kryptogene hjerneabscessene.

### **Hematogen spredning.**

Rundt regnet 1/4 av pasientene med hjerneabscess har metastatisk oppstått sykdom. Multifokale hjerneabscesser er sjeldne, men hematogen spredning er årsak hos omtrent halvparten av disse tilfellene. Pasienter med hematogent forårsaket hjerneabscess har ofte multiple abscesser lokalisert i vannskillet mellom grå og hvit substans, hyppigst i forsyningsområdet til arteria cerebri media. Abscessene viser mindre grad av innkapsling og er forbundet med dårligere overlevelse. Primærfokuset er hyppigst intrathorakalt. De vanligste tilgrunnliggende tilstandene er lungeabscess eller bronkiektasier, mens hjerneabscess hos pasienter med bakteriell endokarditt ses hos 0-5% av disse pasientene. Risikoen synes høyest for dem med Staphylococcus aureus-endokarditt. Forekomsten av hjerneabscess hos pasienter med persisterende arteriovenøse malformasjoner er så høy at det er aktuelt å utføre hjerte-karutredning av selekterte pasienter med hjerneabscess med hematogen spredning.

### **Hjerneabscess etter hodetraume og nevrokirurgi.**

Hodetraumepasienter løper risiko for å utvikle påfølgende hjerneabscess, men pasientgruppen er liten. Penetrerende, voldelige skader, uhell med spisse gjenstander og impresjonsfrakturer kan forårsake tilstanden. Hjerneabscess etter kraniotomi er sjelden, men pasienter som får postoperativ lekkasje av cerebrospinalvæske, eller der det anlegges

eksterne dren, synes å løpe større risiko enn andre nevrokirurgiske pasienter for å utvikle hjerneabscess.

**Ved hjerneabscess er det er sammenheng mellom primært infeksjonsfokus, abscesslokalisasjon og mikrobiologisk etiologi.**

Pasienter med hjerneabscess rammes oftest frontalt (ca 40%) eller temporalt (ca 40%). Parietalt, oksipitalt, cerebellart ses mindre hyppig, mens intrasellære abscesser og basalganglieabscesser er uvanlige. Ved positiv kultur er det funnet polymikrobiell infeksjon hos omtrent ¼ av pasientene. Funn av mikrobe avhenger av primærfokus, abscesslokalisasjon og av vertsfaktorer som alder og immunstatus. Hyppighetene i dyrkningspositive analyser er omtrent 40% for alle streptokokker, derav 2/3 viridansstreptokokker, 25% Enterobacteriaceae, hyppigst Proteus sp. og 22% Bacteroides sp. En oversikt over sammenhengene er angitt i tabell 1.

**Tabell 1. Sannsynlig abscesslokalisasjon og mikrobefunn ved ulike primære infeksjonslokaliseringssteder og i selekterte pasientgrupper.**

Det primære infeksjonsfokus	Sannsynlig abscesslokalisasjon	Vanligste bakteriologiske funn
Otogen (1/3)*	Temporalt, cerebellart	Streptokokker, Bacteroides sp., Prevotella, Enterobacteriaceae (Proteus), Pseudomonas, Staph.aureus
Bihuler paranasalt /1/10)	Frontalt (Sella turcica)	Streptokokker. (milleri-gruppen), Bacteroides sp., Staphylococcus aureus, Haemophilus sp.
Odontogen (1/50)	Frontalt	Streptokokker, Bacteroides sp., Fusobacterium sp., Prevotella
Hematogen (1/4)#	Multiple foci, tilfeldig	Staph.aureus, viridans streptokokker
Lunger	Multiple foci, tilfeldig	Stafylokokker, streptokokker, Bacteroides sp., Enterobacteriaceae
Traume/nevrokirurgi (1/7)	Avhenger av fokus for barrierebrudd	Staph. aureus, koagulase negative stafylokokker, streptokokker, Enterobacteriaceae, Clostridium sp.
Immunosuppresjon	Multiple foci, tilfeldig	Listeria monocytogenes, Nocardia sp., Mycobacterium sp. Aspergillus sp., Candida sp., Cryptococcus neoformans

\*I parentes angitt gjennomsnittlig forekomst av primærfokuset blant 1730 pasienter i syv studier.

#Det oppgitte tallet inkluderer lungefokus. Etter Kastenbauer, S., et al (1).

**Konklusjoner:**

Hjerneabscess er sjelden og oppstår oftest sekundært til annen infeksjon. Diagnosen stilles først og fremst ved røntgenundersøkelser. Det er sammenheng mellom primærfokus, abscesslokalisasjon og mikrobiologiske funn. De fleste pasienter behandles kirurgisk. Undersøkelse av abscessmateriale fra kirurgi stiller store krav til de mikrobiologiske laboratoriene, fordi abscessmaterialene vanligvis inneholder mer enn en mikrobe, og fordi mikroben kan være påvirket av antibiotikabehandling, kan være kravfulle eller vanskelige å identifisere sikkert. De fleste andre analyser enn mikrobiologiske analyser av abscessmateriale er av begrenset nytte for klinikere som behandler pasienter med hjerneabscess.

**Litteratur:**

1. Kastenbauer, S. Pfister H-W, Wispeley B., and Scheld W.M. Brain abscess. 479-507. I Infections of the central nervous system, 3<sup>rd</sup> ed. Scheld, W.M., Whitley R.J., and Marra C.M., eds. Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia, PA, USA. ISBN 0-7817-4327-3 Tunkel, A.R. Brain abscess. I Principles and practice of infectious diseases, 6<sup>th</sup> ed.
2. Tunkel, A.R. Brain abscess. I Principles and practice of infectious diseases, 6<sup>th</sup> ed. Mandell G.L., Bennett, J.E., and Dolin R., eds. Elsevier, Philadelphia, PA, USA. ISBN 0-443-06643-4
3. Southwick, F.S, Calderwood S.B. and Thorner, A. Pathogenesis, clinical manifestations, and diagnosis of brain abscess. [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com)

## 2.2 Prøvetaking, oppbevaring og transport

– inkludert håndtering/evt. utsæd utenom laboratoriets åpningstid

*Eivind Ragnhildstveit, Mikrobiologisk avd., Sykehuset Østfold, Fredrikstad*

### Innledning.

- Nøyaktig diagnostikk og god behandling av CNS infeksjoner er avhengig av mest mulig eksakt etiologisk diagnose (2).
- Å finne den kausale mikroorganisme krever at det tas riktige prøver til riktig tid, transport av prøven til laboratoriet under optimale forhold, rask og adekvat behandling av prøven i laboratoriet, og valg av nødvendige tester for å kunne identifisere et spektrum av mulige etiologiske agens (2).
- God kommunikasjon mellom klinikk og laboratorium er helt avgjørende (2).
- Klinikk og epidemiologi er veiledende for prøvetaking, valg og omhendetaking av prøvemateriale, og delvis for valg av laboratorium (1).
- Adekvat utfylt remisse, spesielt med navn og tlf.nr. til den kliniker (evt. avdeling) som skal kontaktes om svaret (1).
- Alle prøver bør om mulig tas før oppstart av antibiotikabehandling (1).

### Aktuelle prøvematerialer.

#### 1. Spinalvæske (1,2,6).

Bør om mulig tas så raskt som mulig ved spørsmål om meningitt. (Dersom diagnosen krever påvisning av intratekal antistoffproduksjon tas ny sp.v. prøve 1 – 2 uker etter innsykning)

#### a) Prøvetakingsrør (1,5):

- a) Sterilt rør med skrukork, uten tilsetning.
- b) Blodkulturflasker (barneflasker), 1 aerob (og evt. 1 anaerob) flaske. Spinalvæske på blodkulturrør er spesielt viktig dersom pasienten har fått antibiotika før prøvetaking, og man anbefaler da 0,5 ml. sp.v. injisert på en aerob blodkulturflaske (barneflaske).

#### b) Prøvetaking / Forsendelse (1,2,5,6):

- Prøven tas sterilt. Desinfiser huden (0,5 % Klorhexidin i 70 % etanol, virketid 1 min.).
- Bruk hansker og munnbind.
- Unngå blodtilblanding.

Minst 1-2 ml, helst 2-3 ml (minimum 4 dråper), sendes straks til bakt.lab. for raskt å gjøre direkte mikroskopi, dyrkning og evt. antigenesting.

Spinalvæsken bør dyrkes snarest, og senest innen 4 timer etter prøvetaking .

Dette er Øyeblikkelig hjelp prøver, både i klinikk og laboratorium. Det er en fordel om laboratoriet kan varsles om at sp.v. er i vente.

#### Utenom lab. åpningstid / Lang avstand klinikk – lab. (2,5):

- Dersom det ikke er mulig å sende prøven til laboratoriet straks (innen 2 – 4 timer), anbefales direkte utsæd på blod og sjokoladeagar, evt. også på aerob blodkulturflaske, umiddelbart etter prøvetaking.
- Utførelse: Det dryppes 4-5 dråper sp.v. direkte på blod- og sjokolade-skål, evt. tilsettes også 0,5 ml.sp.v. til aerob barneblodkulturflaske.

- Skålene, evt. også blodkulturflasken, inkuberes ved 35 – 37 °C, om mulig i CO<sub>2</sub> atmosfære, og sendes til det mikrobiologiske laboratorium så snart som mulig .
- Det bør lages 2 utstrykspreparater til mikroskopi. Et preparat kan Gram farges på stedet, og et preparat sendes ufarget sammen med den overskytende spinalvæske og de inokulerte medier til det mikrobiologiske laboratorium. Påse at preparatet er tørket før det pakkes for sending.
- Det en fordel også å sende noen dråper spinalvæske dryppet på en pensel som settes i kullmedium, evt. COPAN transportmedium.
- Aktuelle avdelinger og ”perifere” sykehus bør ha medier til bruk utenom laboratoriets åpningstid og ved lang forsendelse.

#### c) Oppbevaring (2,4,5,6,7):

- Spinalvæske til utsæd for bakterier oppbevares og transporteres best ved romtemperatur.
- Sp.v. til andre undersøkelser (f.eks. PCR ) oppbevares kjølig (< 24 t), evt, fryses – 20 grader (> 24 t).
- Sp.v. som blir til overs lagres ved 4 ° og/eller ved -20 for evt. senere forsendelse med tanke på virus og genmolekylære us.
- Sp.v. kastes etter 2 uker dersom alle analyser har gitt negativt resultat

#### d) Ønskelig spinalvæske-volum (2,5,7):

- Bakteriologisk dyrkning.....2 ml ( 1 ml )
- Soppdyrkning.....2 ” evtnt gjentatte prøver
- Mykobakteriedyrkning.....2 ” ( 5-10 ml)
- Virusundersøkelser , evt. serologi ..... 3 ”
- Antigenpåvisning .....1 ”
- Genmol. Analyser.....1 ”
- Parasittologisk us. ....1 ” ( 1-5 ml )

Ved en spinalpunksjon tappes det gjerne 1 – 2 ml. i hvert av 3 rør. Det anbefales å bruke rør nr. 2 til bakteriologisk us. dersom alle rør har likt utseende. Bruk ellers det mest blakkede rør til bakteriologisk us.. Det totale spinalvæske volum som dyrkes er viktigere enn fra hvilket rør det dyrkes.

## 2. Abscessmateriale / Aspirat / Puss / Irrigasjonsvæske (1,2,5,6).

- Huden desinfiseres. Abscessmateriale aspireres i steril sprøyte, forsegles (beskyttelses hylse på kanylen), direkte transport til laboratoriet.
- Alternativt kan abscessmateriale sprøytes på blodkulturflaske, f.eks. en aerob og en anaerob flaske. Bytt kanylen når materialet skal overføres til dyrkningsmedium.
- Evt. steril prøvepinne som settes i PRAS medium (oksygenfritt miljø).
- Transporteres omgående (< 1 time) til laboratoriet (Obs! anaerob)
- Store volum om mulig, prøverør fylles helt.
- I påvente av transport oppbevares prøven i kjøleskap, men ved mistanke om anaerob er romtemperatur best.
- Prøve utsådd på dyrkningsmedium settes ved 37 ° eller romtemp. før transport til laboratorium.

### **3. Materiale ved mistenkt shunt-infeksjon (1,2,7).**

- De fleste infeksjoner oppstår i løpet av de første par mnd. etter at shunten er plassert.
- Av alle shunter får i 3 – 10 % en infeksjon.
- Til prøvetakning brukes sterilt rør med skrukork. Klipp av 4 - 5 cm av kateterets distale del og før kateterbiten ned i det sterile prøverøret. Sendes raskest mulig til laboratoriet. Oppbevares i kjøleskap i påvente av transport.
- Nåleaspirasjon fra shunt-reservoar, 1 – 2 ml.  
Evt. spinalvæske tatt ved vanlig spinalpunksjon (Gir ikke alltid like mye).  
Sårsekret rundt shunt.
- Blodkultur.

### **4. Biopsi / vevsprøver (1.7)..**

- Ved alvorlige encephalitter. Utføres av nevrokirurg.
- Bør avklares / avtales med laboratoriet. Akutt transport.
- Sterilt rør med skrukork, evt. tilsatt 0,2 ml sterilt saltvann for å hindre uttørking. Evt. plasser biopsien på en kompress fuktet med saltvann.
- Kjøleskap i påvente av transport (ved aerob mistanke). Romtemp. ved anaerob mistanke.
- Det bør også sendes en bit til Patologisk-anatomisk lab.

### **Andre aktuelle prøvematerialer.**

#### **1. Blodkultur (2,3):**

- Alltid indisert ved diagnostikk av systemisk infeksjon, også CNS-infeksjon .
- Ta 2 – 3 blodkultursett pr. 24 timers periode, dette er også viktig ved mistanke om candida og kryptokokk meningitt.
- Blodkultur er nest etter spinalvæske den viktigste prøve ved mistanke om bakteriell meningitt.
- Ca. 10 % (?) av bakterielle meningitter vil ha negativ sp.v. dyrkning, men positiv blodkultur.

#### **2. Urin (2):**

- Kan være aktuelt for antigenesting (kryptokokk og pneumokokk).

#### **3. Serum (1,2):**

- Ta alltid akutt serum, 0-prøve, evt. neste prøve 1 – 2 uker senere.
- For bestemmelse av intratekal antistoffproduksjon tas, sendes og undersøkes serum parallelt med spinalvæske.
- Kan oppbevares ved romtemp. i 1 døgn, ved lengre tids lagring/transport ved 4 °C.
- Mest aktuelt ved mistanke om Borrelia, Lues, Toxo, Cryptococcus, Leptospira, Mycoplasma, Parasitter og Virus. Bakterieantigenesting (?).
- Bør ha 1 ml. serum pr. antistofftest.

#### **4. Nasopharynx-prøve, halsprøve , evt. øre-prøve (1,7,8 ):**

- Spesielt aktuelt ved en CNS-infeksjon i forbindelse med luftveisinfeksjon, evt. en otitt. Fortrinnsvis aspirat. Hals - inngangsport for meningokokker.
- Utbruddsopklaring. Bærerskap. Pas. fått antibiotika før spinalpunksjon.

### 5. Blemmeinnhold / hudlesjoner / petekkier (1,2):

- Dersom der er blemmer eller hudlesjoner, og disse kan tenkes å ha forbindelse med aktuell CNS-infeksjon, tas prøve, fortrinnsvis et aspirat. Bruk transportmedium (Stuart, Amies , COPAN)
- Aspirat fra petekkier er omdiskutert.

### 6. Leddvæske, pleuravæske, pericardvæske (1):

- Ved mistanke om septiske metastaser.

### 7. Obduksjonsmateriale (1,7).

- Sterilt prøverør med skrukork.
- Steril plastbeholder med tett lokk.
- Tas snarest etter døden. Anvend steril teknikk.
- Hjerteblood, spinalvæske, cyste og abscessinnhold: Aspirer 3 – 5 ml. i steril sprøyte og overfør til sterilt rør, evt. direkte til dyrkningsmedier (faste og flytende ). Evt. prøvepinne i transportmedium.
- Vevsbiter: Steril prøvetaking. Overflatesteriliser prøven ved å dyppe den i absolutt alkohol (99,9 % ) som antennes / flamberes . Legges så i steril beholder.  
Formalin må ikke tilsettes.  
Transport: Oppbevares i kjøleskap i påvente av transport. Obs. anaerob – i romtemperatur.

### Konklusjoner.

Dette er alvorlige infeksjoner og god kontakt mellom klinikk og laboratorium er derfor ekstra viktig for å få tatt riktige prøver raskt, rask transport av prøven, og klar melding om hvem som skal ha svar på analyseresultatet.

Spinalvæske er den viktigste prøven, bør ha minimum 2 ml, bør dyrkes snarest, og senest innen 4 timer etter prøvetaking. Bør oppbevares ved romtemperatur i dette tidsrom. Ved større avstander til laboratorium bør spinalvæsken dyrkes på stedet; egnede dyrkningsmedier må være tilgjengelig. Overskytende spinalvæske oppbevares ved 4 °C.

Blodkultur er den viktigste prøve nest etter spinalvæske, og flere blodkulturer kan være aktuelt.

Ved abscessmateriale bør det tilstrebes så stort volum som mulig, rask transport , evt. sprøyte noe over på en blodkulturflaske.

Ved mistenkt shunt-infeksjon bør det foretas nåleaspirasjon fra shunt-reservoar, 1-2 ml.

Andre aktuelle prøvematerialer er:

Biopsi / vevsprøver , urin , serum , nasopharynx-prøve, halsprøve , evt. øreprøve.

Blemmeinnhold/ hudlesjoner/ hetekkier, leddvæske, pleuravæske, pericardvæske, ved mistanke om septiske metastaser.

Obduksjonsmateriale.



### **Litteratur :**

1. Hallander H , Linde A , Henriques B , red. Referensmetodik før laboratoriediagnostik vid kliniskt mikrobiologiska laboratorier. I Infektionsdiagnostik, I 9 Infektioner i centrala nervsystemet (CNS). SMI-tryck nr 114 – 1997.
2. Thomson RB, Bertram H. Laboratory diagnosis of central nervous system infections. *Infect Dis Clin North Am* 2001; 15: 1047-1071.
3. Fuglsang-Damgaard D, Pedersen G, Schønheyder HC. Positive blood cultures and diagnosis of bacterial meningitis in cases with negative culture of cerebrospinal fluid. *Scand J Infect Dis* 2008; 40: 229-233 .
4. Høiby EA, Sandven P, Solberg O. Effect of temperature on the survival of *Neisseria meningitidis* . *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect B*, 1984; 92: 73-77 .
5. *Clinical Microbiology Procedures handbook*. Editor in Chief Henry D Isenberg, volume 1, 2<sup>nd</sup> edition 2004 , ASM press : 2.1. , 3.6. , 3.7.
6. Murray, PR ed. in chief . *Manual of Clinical Microbiology*, 9<sup>th</sup> edition, ASM Press 2007  
Miller JM et al. *General Principles of Specimen Collection and Handling* : 43-54 , and Thomson, RB . *Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology* : 291-333 .
7. Mandell, Douglas, and Bennett`s *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Vol 1, sixth edition, 2005. Gill VJ, Fedorko DP, Witebsky FG. *The Clinician and the Microbiology Laboratory* . Chapter 15, 203.
8. Kristiansen BE, Tveten Y, Ask E et al. Meningokokkprosjekt Telemark. *Tidsskr Nor Lægeforen* 1993; 113: 2933 -7.

## 2.3 Direkte mikroskopering: indikasjon, aktuelle prøvematerialer og metoder

*Einar Vik, Molde sjukehus, Helse Nordmøre og Romsdal HF*

### **Aktuelle prøvematerialer:**

Spinalvæske  
Puss frå operasjon  
Kateter – frå shunt  
Hjernebiopsi

### **Indikasjon for mikroskopi av spinalvæske:**

Mistanke om bakteriell meningitt

### **Sentrifugering av spinalvæsker:**

**Hvis blakka** – uansett mengde: lag preparat direkte og så ut ubehandla spinalvæske.

### **Klar spinalvæske:**

Hvis < 0,5 ml – ikkje sentrifuger. Lag preparat og så ut.

Hvis rikeleg: sentrifuger 15 min.  
Vanleg brukt: 1000 g i 15 min.  
(Skrivest også som x g)

Svensk bok (ref 1) anbefaler 1500 – 2500 g i 15 min.

Ta supernatant over i sterilt glas. Så ut frå pellet og lag 2 – 3 preparat som lufttørkes.  
Det hevdes at det er unødvendig å sentrifugera før utsæd, der er nok mikrober for vekst med vanleg inokulum – nokre dråpar.

### **Cytospin** (Clinical Microbiology Procedures Handbook - 3.7)

Cytospin seiest å kunna auke sensitiviteten ved mikroskopi med ein faktor på 100.

Her i landet brukar Mikrobiologisk avdeling på Ullevål cytospin på klare spinalvæsker.  
Til dette brukes ei lita spesialsentrifuge der 2 dråpar sentrifugerast rett på objektglas – 8 min på 1800 rpm (uvisst kor mange x g dette gjev).  
St. Olavs hospital bruker dette med tanke på tbc i spinalvæske.

Bakterietal ved meningitt kan vera ned til 10 cfu/ml – dette gjer cytospin-konsentrering fornuftig.

### **Kanskje burde fleire av oss ta dette opp?**

Dette fargast med acridin-orange, gram hvis funn på acridin-orange.

## **Nativpreparat/ våtpreparat**

**Indikasjoner:** Mistanke om soppinfeksjon.

Kan farges med tusj eller nigrosin hvis mistanke om *Cryptococcus neoformans* eller Candida-infeksjon. Mikroskopi av bunnfall etter sentrifugering.

Calcofluor white (CFW) er eit fluoriserande fargestoff som bind seg til chitin i celleveggen til sopp. Kan blandast med spinalvæska – evt. etter sentrifugering. CFW kan også leggjast rett på eit Gram-farga preparat. Legg eit dekkglass over væska. Lat virke nokre minuttar i mørke før preparatet leses i fluorencensmikroskop. Fargen på positive celler avheng av kva bølgelengd lyset har.

Kan vurderast på 100 x forstørrelse, evt. større ved funn.

## **Felles prosedyre for lagging av preparat.**

Hvis blank væske: la nokre dråpar tørke på objektglaset.

Hvis tjukk og/eller blakka væske: dra utover og la lufttørke. Vi tilstreber eitt cellelag. Tjukke preparat – leses ved 1 cellelag – finn eit tenleg område med liten forstørrelse.

Oppvarming for å spare tørketid kan vera risikabelt – i vandig oppløsning kan cellene/bakteriene deformerast.

Biopsi: avtrykk av frisk flate på objektglas + mortre og spre på objektglas, tilstrebe 1 lag for mikroskopering.

Fiksering: hefter bakterier til glaset, bevarer form og ordning av bakteriene, hindrer oppsvulming og hindrar aktivitet frå autolytiske enzym i materialet. Ikkje nødvendig med spritvask av objektglas eller av dekkglas.

Flammefiksering:

Dra gjennom flammen ca 1 sekund x 3 med preparat-sida opp.

Ein skal tåle varmen av baksida mot handryggen (tvilsomt i praksis)

For kraftig varme: kan øydelegge cellenes fargeeigenskapar - gram-positive kan bli gram-negative.

## **Fargemetodar:**

**Mange av fargestoffa er toksiske og krev avtrekk og hanskar ved bruk.**

På <http://www.ecoonline.no/> finn vi informasjon om dei ulike stoffa.

## **Gram:**

Utvikla ca 1884.

Vår viktigaste fargemetode, mange modifikasjonar finnest.

Det er framleis diskusjon om fargefysikken ved farging. Denne teori dominerer:

Ulikheter i celleveggen gir ulik permeabilitet for alkohol, jod og jod-fargepresipitat hos gram-positive og gram-negative bakteirer.

Gram-positive bakterier har stort innhald av mucopeptid, tjukt peptidoglykanlag. Dette gjer at veggen dehydreres under avfarging og komplekset av jod og farge blir vanskeleg tilgjengeleg for alkohol ved avfarging.

Gram-positive bakterier beheld altså jod-fargestoff-komplekset og er svart-blå etter avfarging med alkohol dersom veggen er intakt. Kontrastfarge øydelegg ikkje dette.

Gram-negative bakteriers vegg inneheld mykje lipid med tynt peptidoglykanlag. Ytre membran skades av alkoholen og komplekset med krystall-fiolett og jod lek ut. Bakteriene farges med kontrastfarge til slutt.

### Farging –

Det er i handelen maskiner for automatisk farging av preparat. Dette vil kunna gje jevnare og meir reproduserbar farging enn dei manuelle metodar mange brukar.

Farging kan elles utføres enten i fargebad eller ved floating (ved bruk av fargebad bør Gram 1, 2 og 4 skiftes ein gong i veka, Gram 3 skiftes dagleg).

#### Gram 1 - krystallviolett

Bind seg til sure strukturar i cella.

Ubegrenset holdbarhet, men filtreres før bruk hvis utfelling.

#### Gram 2: – jod – jodkalium

5 – 15 sek skylling med springvann er nok mellom 1 og 2 (men lengre tålest godt)

#### Gram 3 - 96 % alkohol.

Konsentrert alkohol trenger vanskelegare inn i Gram-positive bakterier enn i Gram-negative.

Preparatet bør ikkje tørka i prosessen, avfargingstid vil i så fall auke.

Etter gram 3: kun 5 sek skylling. Blanding av vatn og alkohol kan avfarge meir enn alkohol aleine.

#### Gram 4: safranin

Kontrastfarge bør skylles fort av (5 sek) med springvatn, fargestoff kan vaskes ut (før brukte vi karbolfuksin, safranin er mindre toksisk).

Vi (Molde) brukar ca 5 min: 1,5 min + 1,0 + 0,5 + 1,0 på vår måte.

Der finnest variantar for farging på ned til 15 - 20 sek. Dette kan vera viktig der det er store mengder prøver (men neppe problemstillinga ved CNS-infeksjonar).

Leses med 1000 x forstørrelse.

Forstørrelse: produkt av okular og objektiv.

Olje brukes for å hindra lysbryting mellom preparatet og objektivet.

## **Acridin orange**

DNA farges med denne metoden.

Indikasjoner:

- a) klar spinalvæske
- b) uklar spinalvæske der vi ikkje finn mikrober.
- c) Preparat som inneheld mykje puss og celler uten klart bakteriefunn, evt. ved blodtilblanda væske.

Fargevariantar: bakterier og sopp: klart orange.

Celler og debris: bleikgrøn til gul.

Erytrocyttar – bleikt grøne eller ingen farge.

Vi les med 400 x forstørrelse, slepp då å fjerna olje før evt. Gramfarging.

Deteksjonsgrense: 1000 cfu/ml.

Ref 2 - Clinical Microbiology Procedures Handbook: anbefaler å sjå med olje på 1000 x forstørrelse.

Gram kan fargast direkte på acridin orange – etter fjerning av olje. Bruk linsepapir forsiktig.

Acridin Orange kan fargast over Gramfarging - etter fjerning av olje.

## **Direkte immunfluorescens**

---

Dette er i dag lite brukt ved CNS-infeksjonar. Seiest å auke sensitiviteten ved bakterielle infeksjonar i CNS, Men Ref 1 beskriv problem med å skaffa gode reagenser.

Farging:

Etter flammefiksering: ha på konjugat, inkubering 20 min i 37 °C, skyl med PBS, deretter stå i kyvette med destillert vatn i 5 min.

Tørk forsiktig rundt preparatet, legg på dekkglas med bufra glycerol.

Lesest på 400 x forstørrelse.

---

## **Kjente trekk:**

Meningokokkar intra- og ekstracellulært.

Pneumokokkar – evt. med kapsel

Haemophilus influenzae – kan ha enkelte lange, filamentøse stavar, elles kokkoide stavar.

Kan forvekslast med pneumokokkar

Listeria – få mikrober i spinalvæska, sjelden funne ved direkte mikroskopi

Ferske spinalvæsker gjev betre preparat enn eldre væsker. Henfall av leukocyttar gir dårlegare farging av bakterier.

Få laga lufttørka preparat dersom det er sendetid før prøven når laboratoriet.

Lavare treffprosent om pas. har fått antibiotikum.

Antibiotikabehandling kan gjera at Gram-positive mikrober blir Gram-negative – (pga øydelagt cellevegg).

## Referanser:

1. Referensmetodik før laboratoriediagnostik vid kliniskt mikrobiologiska laboratorier  
I. Infektionsdiagnostik  
I 9. Infektioner i centrala nervsystemet (CNS) (1997)  
Smittskyddsinstitutet
2. Clinical Microbiology Procedures Handbook (USA - 2004)  
Editor in chief: Henry D. Isenberg  
Second edition  
ASM Press
3. Bakteriologiske undersøgelsesmetoder  
Hans Lautrop  
Niels Høiby  
Annie Bremmelgaard  
Birgitte Korsager  
(Danmark 1978)

## 2.4 Utsæd og dyrkningsbetingelser

*Andreas Emmert, Sykehuset i Vestfold HF*

### 2.4.1 Valg av medier

#### Cerebrospinalvæske:

1. All cerebrospinalvæske (CSV) skal dyrkes på Blod- og Brun-skål (1- 6). Anrikning er ikke rutinemessig nødvendig med mindre CSV fra pasienter med en shunt eller et eksternt reservoar dyrkes (1,7-12).
2. Det finnes ingen systematisk sammenligning av de ulike anrikningsbuljonger, men de artikler som omhandler emnet viser at dyrkning på blodkulturflasker med og uten supplement gir høyere sensitivitet sammenlignet med konvensjonell dyrkning og anrikning på buljong. (13,14). Ekstra tilsats for eksempel av Isovitalax eller FOS (fastidious organism supplement) kan være fordelaktig, men dokumentasjonen er sparsom (12,13,15).
3. Anaerob dyrkning av CSV bør anvendes ved risikofaktorer for infeksjoner med anaerob etiologi som v/ mastoiditt, kronisk sinusitt, hjerneabscess, subdural empyem, epidural abscess, ved postoperativt infeksjon og ved shunt (1-5).
4. Ved dyrkning med tanke på sopp bør en Sabouraud skål inkluderes. Dette bør alltid gjøres dersom pasienten er immunkompromitert.

**Sammendrag:** Rutinedyrkning skjer på Blod- og Brun-skål. Anaerob utsæd bør alltid vurderes utefra klinisk problemstilling. Utsæd på selektivt soppmedium bør alltid inkluderes ved mistanke om soppinfeksjon og ved CSV fra immunkompromiterte pasienter. Anrikning av spinalvæske er ikke rutinemessig anbefalt. Ved shuntinfeksjon anbefales anrikning i buljong pluss eventuell aerob og anaerob blodkulturflaske. Ekstra tilsats i anrikningsmediene kan være fordelaktig.

#### Shuntinfeksjon:

Dyrkning av selve shunten og CSV i eller rundt shunten (2):

1. CSV sås ut som over, men anaerob utsæd og soppdyrkning bør inkluderes. Om det er nok CSV bør aerob og anaerob anrikning i 7-10 dager utføre (16).
2. Selve shunten bør legges i buljong og inkuberes i 7-10 dager ved 37°C (16).

#### Abscesser i CNS:

1. Ved dyrkning av hjerneabscess eller biopsi: aerob utsæd på Blod- og Brun-skål. Om mye materiale inkluder Laktose og Manitt skål (1-5).
2. Anaerob utsæd inkludert Actinomyces dyrkning som inkluderer anaerob buljong bør alltid utføres ved mistanke om hjerneabscess (1).
3. Selektiv sopp-medium bør alltid inkluderes.
4. Aerob og anaerob anrikning skal alltid utføres.

## 2.4.2 Valg av inkubasjonsatmosfære og inkubasjonstid

### Cerebrospinalvæske:

1. Ved rutineprøver skal skålene inkuberes i 48-96 timer (1, 3, 6) ved 35-37 °C i aerob atmosfære med 5-10 % CO<sub>2</sub>.
2. Anrikningsbuljong skal inkuberes i 37 °C i aerob atmosfære uten CO<sub>2</sub> i minst 5 dager (3,7,13). Blodkulturflasker (aerob og anaerob) inkuberes rutinemessig i 5-7 dager (13,14).
3. Anaerobe skåler bør dyrkes i 5 dager (1).
4. Evnt. selektivt soppmedium bør dyrkes i aerob atmosfære ved 30 °C i minst 3 uker (1,6).

### Shuntinfeksjon:

1. Ved shuntinfeksjoner skal aerobe skåler inkuberes i 48-96 timer 35-37 °C i aerob atmosfære med 5-10 % CO<sub>2</sub>.
2. Anrikningsbuljong skal inkuberes i 37 °C i aerob atmosfære uten CO<sub>2</sub> i 7-10 dager (16). Blodkulturflasker (aerob og anaerob) inkuberes rutinemessig i 7-10 dager (16).
3. Anaerobe skåler bør dyrkes i anaerob atmosfære ved 37 °C i 5 dager (1).
4. Evnt. selektivt soppmedium bør dyrkes i aerob atmosfære ved 30 °C i minst 3 uker (1,6).

### Abscesser i CNS:

1. Aerobe skåler skal inkuberes i 48-96 timer 35-37 °C i aerob atmosfære med 5-10 % CO<sub>2</sub>.
2. Anaerobe skåler bør dyrkes i anaerob atmosfære ved 37 °C i minst 5 dager (1). Ved hjerneabscess bør dyrkning med tanke på *Actinomyces* utføres – dvs. 12 dagers inkubasjon (1).
3. Selektivt soppmedium bør dyrkes i aerob atmosfære ved 30 °C i minst 3 uker (1,6).
4. Anrikningsbuljong skal inkuberes i 37 °C i aerob atmosfære uten CO<sub>2</sub> i minst 5 dager (3,7,13). Blodkulturflasker (aerob og anaerob) inkuberes rutinemessig i 5-7 dager.

### Unntak fra reglene:

Denne listen kan selvfølgelig ikke være fullstendig. Som alltid gjelder også her at man har god kommunikasjon med klinikerne og tilpasser den mikrobiologiske diagnostikken deretter. Nedenfor er det oppført en liste med mikrober som ikke nødvendigvis fanges opp ved ovennevnte dyrkningsprosedyrer,

1. *Legionella*: BCYE skål, inkubasjonstid 3-5 dager.
2. *Brucella*: vokser på Blod- og Brunskål. Inkubasjon i 2 uker anbefales.
3. *Francisella tularensis*: vokser på brunskål vanligvis innen de første 3 dager men dyrkning på næringsrike medier (CHAB) i 14 dager anbefales (1) OBS: Biosafety level III- vanligvis diagnose ved hjelp av serologi. Dyrkning har lav sensitivitet.
4. *Bartonella*: vokser på brunskål eller Heart Infusion agar og burde inkuberes i minst 4 uker i 5 % CO<sub>2</sub> atmosfære. Vanligvis diagnostiseres sykdommen ved hjelp av serologi (1).
5. *Nocardia*: Brunskål inkuberes ved 35-37°C i fuktet aerob atmosfære i 14 dager (1).
6. *Cryptococcus neoformans*: Vokser vanligvis innen 36-72 timer på Blodskål.



## Referanser

1. Manual of Clinical Microbiology, 9<sup>th</sup> ed. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Lauray ML, Pfaller MA., eds. ASM Press, 2007.
2. Principles and Practice of Infectious Diseases, 6<sup>th</sup> ed. Mandell G.L., Bennett, J.E., and Dolin R., eds. Elsevier, Philadelphia, PA, USA 2006.
3. Gray LD, Fedorko DP. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. Clin Microbiol Rev 1992; 5, 130-145.
4. Topley & Wilsons Microbiology and Microbial infections, 9<sup>th</sup> ed. Borrelia S.P., Murray P.R. and Funke G., eds. Hodder Arnold, London, UK, 1998.
5. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2<sup>nd</sup> ed., 2004.
6. Koneman`s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th edition. Washington W Jr., Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. eds., 2006.
7. Medical Microbiology, 4<sup>th</sup> edition. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. eds., Elsevier Mosby, Philadelphia, PA, USA, 2002.
8. Dunbar S, Eason RA, et al. Microscopic examination and broth culture of cerebrospinal fluid in diagnosis of meningitis. J Clin Microbiol 1998; 36, 1617-30.
9. Sturgis CD, Peterson LR, Warren JR. Cerebrospinal fluid broth culture isolates; their significance for antibiotic treatment. Am J Clin Pathol. 1997; 108: 217-21.
10. Lessing MPA, Bowler ICJ. The value of cerebrospinal fluid enrichment culture in the diagnosis of acute bacterial meningitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Januar 1996; 1: 79-82.
11. Meredith FT, Phillips HK, Reller LB. Clinical utility of broth cultures of cerebrospinal fluid from patients at risk for shunt infections. J Clin Microbiol 1997; 35, 3109-3111.
12. Reinhold CE, Nickolai DJ, Piccinini TE, Byford BA, York MK, Brooks GF. Evaluation of broth media for routine culture of cerebrospinal fluid specimens. Am J Clin Pathol. 1988; 89: 671-4.
13. Fuller DD, Davis TE, Kibsey PC, Rosmus L, Ayers LW, Ott M, Sabouille MA, Sewell DL. Comparison of BACTEC Plus 26 and 27 Media with and without Fastidious Organism Supplement with Conventional Methods for Culture of Sterile Body Fluids. J Clin Microbiol 1994; 32: 1488-1491.
14. Bourbeau P, Riley J, Heiter BJ, Master R, Young C, Pierson C. Use of the BacT/Alert blood culture system for culture of sterile body fluids other than blood. J Clin Microbiol 1998; 36:3273-7.
15. Akcam FZ, Yayli G, Uskun E, Kaya O, Demir C. Evaluation of the Bactec microbial detection system for culturing miscellaneous sterile body fluids. Res Microbiol 2006; 157: 433-436.
16. Arnell K, Cesarini K et al. Cerebrospinal fluid shunt infections in children over a 13-year period: anaerobic cultures and comparison of clinical signs of infection with Propionibacterium acnes and with other bacteria. J Neurosurg Pediatrics 2008; 1: 366-372.

## 2.5 Antigenpåvisning i CSV (evt. også urin) - indikasjoner og metoder

Mette Walberg, Sykehuset Asker og Bærum HF

### Bakterielle infeksjoner i CSV (også kryptokokker)

#### Latex agglutinasjonsteknikker

- *H. influenzae* type B
- *S. pneumoniae*
- *N. meningitidis*
- *E. coli* K1
- Streptokokker gruppe B
  
- *C. neoformans*
  
- Sensitivitet og spesifisitet

		Syk		
		Pos	neg	
Test	Pos	180	400	580
	neg	20	400	420
tot		200	800	1000
Prevalens		20 %	200 av 1000	
Sensitivitet		90 %	180 av 200	
Spesifisitet		50 %	400 av 800	
PPV		31 %	180 av 580	
NPV		95 %	400 av 420	

Hayden RT and Frenkel LD 2000

PIDJ 19:290-2

- Retrospektiv review av CSV latex testing (Illinois, USA) på pediatrik materiale
- Metode
  - 6400 CSV latex tester (1995-1996) vs dyrkning
- Resultater
  - CSV sens 70 %
  - CSV spes 99 %
  - Urin sens 27 %
  - Urin spes 87 %
  - Falsk neg=13 / falsk pos=59

Sanne tester førte ikke til endring av beh

Usanne tester førte til unødvendig beh/utgifter

- Konklusjon (Latextester):
  - Lav (for lav?) sensitivitet/spesifisitet for screeningformål
  - Riktige resultater har ingen eff. på klinisk forløp
  - Gale resultater genererer store utgifter

Tarafdar K et al. 2001

CID 33:406-8

- Kultur-negative meningitter i NY, USA
- Konklusjon (latex-test)
  - sensitivitet 7 %

Khyriem AB et al. 2003

Indian J Med Microbiol 21:252-6

- Kroniske kryptokokk-meningitter (kliniske kriterier): sammenligning av to ulike agglutinerings-tester, dyrkning, India ink. Pondyerry, India
- Metode
  - 150 CSV samples
- Resultater
  - 39 samles var positive ved én eller flere metoder
  - CSV (latex) sens 95 %
  - CSV (dyrkning) sens 26 %
- Konklusjon
  - Antigen-påvisning er nyttig tillegg til India ink og dyrkning

Chapin-Robertson K et al. 1993

Diagn Microbiol Infect Dis 17:197-201

- Cryptococcal antigen detection from the urine of AIDS patients. Connecticut, USA
- Metode
  - 92 pasienter, 103 prøvesett
  - CSV, urin, serum (+/- pronase-behandling)
- Resultater
  - Alle pasienter med pos. titer (CSV/serum) hadde pos. titer i urin
- Konklusjon
  - Antigen-påvisning i urin er egnet for påvisning av C-Ag i AIDS-pasienter (bruk av pronase øker sensitivitet)

### **Konklusjon (latex-tester)**

- CSV (meningitt hos barn) ikke berettiget
- Urin (AIDS-pasienter): berettiget

## 2.6 Bruk av genteknologiske metoder ved infeksjoner med bakterier og sopp i sentralnervesystemet

Fredrik Muller, Rikshospitalet

### 2.6.1 Innledning

Innlegget beskriver anvendelse av genteknologiske metoder ved infeksjoner med bakterier, sopp og parasitter i sentralnervesystemet (CNS). Etter avtale med redaksjonen omtales ikke mykobakterier, spiroketer og parasitter.

Den viktigste indikasjonen for bruk av genteknologiske metoder er påvisning av agens direkte i prøvemateriale, særlig der pasienten har fått antibiotika forut for prøvetaking eller der det kan dreie seg om vanskelig dyrkbare eller ikke dyrkbare mikroorganismer.

Anvendelse av genteknologiske metoder vil oftest utgjøre et tillegg til klassiske metoder som dyrkning og mikroskopi. En del genteknologiske metoder er hurtige sammenliknet med dyrkning.

### 2.6.2 Sykdommer

Viktige infeksjonssykdommer i CNS omfatter meningitt, encefalitt, shuntinfeksjon, hjerneabscess, subduralt empyem og epidural abscess. CNS-infeksjoner hos immunsupprimerte kan manifestere seg på ulikt vis (meningitt, encefalitt, abscess), bl a avhengig av graden av immunsuppresjon.

Noen viktige agens er angitt i tabellen nedenfor.

Tilstand	Viktige agens	Kommentar
Bakteriell meningitt	<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>E. coli</i>	Barn og unge voksne < 5 år og over ~ > 65 år Barn. Uvanlig pga vaksine Nyfødte, immunsupprimerte Neonatal meningitt Neonatal meningitt
Sopp meningitt	<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Candida</i> spp.	Sjelden. Obs immun- supprimerte pas.
Shuntinfeksjoner	<i>Staph. Epidermidis</i> <i>Staph. aureus</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Candida</i> spp.	
Encefalitt/encefalomyelitt	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>	Sjeldne agens!
Hjerneabscess, epidural abscess, subduralt empyem	<i>Streptococcus milleri</i> <i>Staph. aureus</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Bacteroides</i> spp <i>Prevotella</i> spp	
CNS-infeksjoner hos immunsupprimerte	<i>Nocardia</i> spp <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	

### 2.6.3 Prøvemateriale

Viktige typer prøvemateriale er spinalvæske, puss, biopsier og shuntspisser.

### 2.6.4 Prøvetaking og transport

Prøver til genteknologiske undersøkelser tas som til øvrig mikrobiologisk diagnostikk. Vanligvis vil DNA være utgangspunkt for de genteknologiske undersøkelsene. DNA er relativt robust med tanke på transporttid, temperatur mv (1;2). Imidlertid er det begrenset dokumentasjon angående hvor stabilt DNA er i ulike typer prøvemateriale, og en bør derfor tilstrebe rask transport til det mikrobiologiske laboratoriet. Det har vært anbefalt at prøven holdes nedkjølt eller frosset dersom det tar mer enn 24 timer fra prøvetaking til ekstraksjon (3).

Ofte vil det være aktuelt å ta prøver etter oppstart av antibiotika. Selv om *N. meningitidis* har vært påvist i spinalvæske inntil 3 døgn etter oppstart av antibiotika, har det vært anbefalt at prøver tas innen 24 timer etter start av behandling (4).

### 2.6.5 Ekstraksjon av nukleinsyre

Ekstraksjon av nukleinsyre er et viktig trinn i genteknologisk metodikk. Kvaliteten på ekstraksjonen er av helt avgjørende betydning for det endelige resultatet, noe som ofte er underkjent.

Følgende krav bør stilles til metode for ekstraksjon av nukleinsyre:

- frigjøre nukleinsyre fra mikroorganismen
- unngå degradering av nukleinsyre
- fjerne substanser som hemmer PCR-reaksjonen ("inhibitorer")
- mulighet til å konsentrere prøven
- automatisering
- lav pris

De senere år har det skjedd en overgang fra manuelle til automatiserte ekstraksjonsmetoder. De manuelle metodene, se f eks (3), er arbeidskrevende og har ofte lavere reproducerbarhet, men kan likevel gi nukleinsyre-ekstrakter av god kvalitet. Til diagnostisk bruk vil de sannsynligvis bli benyttet i svært liten grad i de kommende år. Mange automatiserte systemer anvender magnetiske glasskuler som binder nukleinsyre (5).

For enkelte typer prøvemateriale, bl a biopsier, er det aktuelt med mekanisk dissosiering av vevet før ekstraksjon, f eks ved risting med glasskuler ("bead beating").

Det er viktig at laboratoriet validerer sin(e) metode(r) for ekstraksjon av nukleinsyre.

Spinalvæske inneholder ofte få mikroorganismer og stiller dermed høye krav til ekstraksjon (6). Faktorer som prøvevolum, elueringsvolum (sluttvolum med DNA etter ekstraksjon) og valg av ekstraksjonsmetode er av stor betydning. Metoden må også fjerne inhibitorer (substanser som kan hemme PCR-reaksjonen") (7).

Genteknologiske undersøkelser av formalinfikserte prøver er en spesiell utfordring fordi DNA ofte vil være skadet. Det foreligger spesielle ekstraksjonsprotokoller for undersøkelse av slikt materiale (8). Det anbefales at patologene ekstraherer DNA fra disse prøvene før mikrobiologiske undersøkelser. Generelt vil det være vanskeligere å amplifisere lange sekvenser fra formalinfiksert materiale. Det er her en fordel at man ved sanntids-PCR amplifiserer korte sekvenser.

## 2.6.6 Genteknologiske metoder

Anvendelse av genteknologiske metoder kan deles inn på ulike måter:

1. Amplifikasjonsmetoder vs Ikke-amplifikasjonsmetoder
2. Generelle metoder ("åpne") som kan påvise ulike mikrober (sekvensering) vs spesifikke metoder som kan påvise en/et fåtall ulike mikrober
3. Påvisning av mikrober direkte i prøvemateriale vs i kultur
4. Metoder for
  - a. identifikasjon
  - b. påvisning av resistensgen(er)
  - c. påvisning av virulensgen(er)
  - d. typing av mikroorganismer

### *Ikke-amplifikasjonsmetoder*

Det anvendes DNA- eller PNA (protein nukleinsyre)-prober som er koblet til et signalmolekyl (2), f eks en fluorescerende substans som ved fluorescerende in situ hybridisering (FISH). Metoden har kun anvendelse ved undersøkelse av kultur, f eks ved undersøkelse av spinalvæske som er inkubert i blodkulturbuljong.

### *Amplifikasjonsmetoder*

Polymerasekjedereaksjonen (PCR) er den mest brukte amplifiseringsmetoden, men det er også utviklet en rekke andre metoder som amplifiserer en utvalgt gensekvens. Eksempler på slike metoder er SDA ("Strand displacement amplification"), TMA ("Transcription-mediated amplification"), LCR ("Ligase chain reaction") og NASBA ("Nucleic acid sequence-based amplification"). Teknikkene er nærmere omtalt i (2;9).

PCR-metoden har de senere år blitt videreutviklet, særlig har sanntids- ("real time") PCR hatt stor betydning for mikrobiologisk diagnostikk. Ved sanntids-PCR skjer amplifisering og deteksjon av PCR-produkt samtidig ved hjelp av prober med signalmolekyl eller fluorescerende substanser som binder dobbeltrådet DNA. Dette er nærmere omtalt i (2;9). Ved sanntids-PCR kan undersøkelsen utføres raskt (< 1 time + tid til ekstraksjon), en jobber i et lukket system med liten risiko for kontaminering med amplifisert DNA og metoden åpner for å påvise flere gensekvenser i samme reaksjon (multiplex PCR). Risiko for kontaminering kan reduseres ytterligere ved bruk av uracil-N-glycosylase (UNG) som hindrer falske positive resultater som følge av forurensning fra tidligere analyser (10).

Ved sanntids-PCR og liknende metoder påvises én eller et relativt lite antall gensekvenser ("man får svar på det man spør om"). Ved å velge primere i konserverte flankeområder innen 16S rDNA- eller ITS- (Internal transcribed spacer) regionen der resten av sekvensen varierer for ulike bakterier, kan man ved sekvensering av amplifisert produkt identifisere bakterier med god treffsikkerhet. Dette er mer "åpne" metoder enn sanntids-PCR, dvs at de gir mulighet for å påvise mange ulike agens – vanligvis om de foreligger i renkultur i prøvematerialet. Bruk av bioinformatikk tillater påvisning av opp til 3 mikroorganismer samtidig.

Tilsvarende kan man sekvensere amplifiserte produkter innen 18S rDNA- eller ITS-regionen for identifikasjon av sopp (og parasitter).

Bruk av kontroller er en viktig del av kvalitetssikringen av amplifikasjons-metodene, dette er utførlig beskrevet i tidligere strategirapport fra 2006 (11). Deltakelse i sammenliknende laboratorieprøving ("ringtester") er også en viktig del av kvalitetssikringen. Quality control for Molecular Diagnostics ([www.qcmd.org](http://www.qcmd.org)) og enkelte andre ringtestleverandører sender ut en rekke mikroorganismer for genteknologisk påvisning.

Alle disse amplifikasjonsmetodene kan i prinsippet anvendes for påvisning av gensekvenser fra mikrober i kultur og direkte fra prøvemateriale. Formålet med å påvise en gensekvens kan være identifikasjon av en mikroorganisme eller påvisning av resistens- eller virulensgen(er).

## 2.6.7 Identifikasjon

Tabellen nedenfor, modifisert fra (4), viser en del gensekvenser som har vært anvendt ved påvisning av mikroorganismer som er viktige ved CNS-infeksjoner.

Mikroorganisme	Målsekvens	Kommentar
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>IS1106</i> <i>porB</i> <i>crgA</i> <i>ctrA</i> <i>dhps</i>	Insertjonssekvens Koder for porinet PorB Koder for transkripsjonsregulator Koder for et yttermembranprotein Koder for dihydropteroat syntase
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>lytA</i> <i>ply</i>	Koder for autolysin Koder for pneumolysin
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>bexA</i>	Koder for en komponent i polysakkarid eksport
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>hylB</i>	Koder for hyaluronidase
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Coa</i> <i>Nuc</i> <i>Sa442</i>	Koder for koagulase Koder for nuklease Gen med ukjent funksjon
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hlyA</i> <i>iap</i> <i>mpl</i>	Koder for listerolysin-O Koder for invasjon-assosiert protein Koder for metalloprotease
<i>Aspergillus fumigatus</i>	18S rDNA	

Det foreligger en rikholdig litteratur som omtaler bruk av genteknologiske metoder ved CNS-infeksjoner. En rekke forfattere har arbeidet med genteknologiske metoder som kan påvise de viktigste årsaker til bakteriell meningitt (12-20). For genteknologisk diagnostikk av meningokokk-meningitt har "The European Monitoring Group on Meningococci" (EMGM) utarbeidet egne retningslinjer (21).

Viktige sopparter ved CNS-infeksjoner, særlig hos immunsupprimerte pasienter, omfatter *Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp. og *Aspergillus fumigatus*. I tillegg til mikroskopi, antigenest og dyrkning har PCR vært beskrevet som en sensitiv metode til påvisning av kryptokokker (22;23). Bruk av PCR til påvisning av *Candida* spp. og *Aspergillus fumigatus* er omtalt i en mange rapporter, bl a (24-27).

En rekke andre, sjeldne agens kan gi CNS-infeksjon. I mange tilfelle er genteknologisk diagnostikk til nytte, f eks ved infeksjon med *Nocardia* spp (28;29),

### 2.6.8 Påvisning av resistensgener

Genteknologiske metoder kan også anvendes til å påvise resistensgener, bl a hos *N. meningitidis* (30;31), *S. pneumoniae* (32;33) og *H. influenzae* (34). Dette vil særlig ha interesse ved dyrknings-negative prøver.

### 2.6.9 Typingsmetoder

Genteknologiske typingsmetoder omtales kun kort. De er velegnet til typing av mikroorganismer, f eks for typing av meningokokker (35) eller kartlegging av en mulig utbruddstamme (36;37). Metodene kan deles inn i ikke-amplifiseringsmetoder (f eks pulsfelt gelelektroforese) og amplifiseringsmetoder som MLVA ("Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis"), AFLP ("Amplified fragment length polymorphism") og MLST ("Multilocus sequence typing").

### 2.6.10 Tolkning og vurdering

I motsetning til dyrkningsmetoder, vil genteknologiske metoder påvise både viable og non-viable mikroorganismer. Dette krever særskilt vurdering av resultatene. Ved sanntids-PCR kan det være vanskelig å vurdere betydningen av svakt positive funn.

### 2.6.11 Krav til genteknologisk diagnostikk ved CNS-infeksjoner

Det bør diskuteres hva som bør gjøres av diagnostikk, og hvor (på hvilket nivå) det bør gjøres. Etersom kompetanse og instrumentering styrkes lokalt, vil mange laboratorier kunne utføre en del av diagnostikken som er beskrevet.

Som et minstekrav foreslås følgende:

#### ***Regionalt nivå:***

PCR-metoder for påvisning av vanlige "meningitt-agens"  
16S rDNA sekvensering (eller tilsvarende)

#### ***Nasjonalt nivå:***

PCR-metoder for påvisning av uvanlige agens/agens hos immunsupprimerte  
Sekvensering for påvisning av sopp  
Typingsmetoder, inkl metoder for typing av viktige "meningitt-agens"

### 2.6.12 Fremtidsutsikter

#### ***Forbedring av eksisterende metoder innen diagnostikk***

Det forventes at bruk av genteknologiske metoder vil øke innen mikrobiologisk diagnostikk de kommende år. Sanntids-PCR vil fortsatt være et viktig verktøy og økt anvendelse av multiplex PCR vil gjøre det mulig å påvise flere mikroorganismer samtidig.

Vi vil oppleve en økende grad av automatisering. Kostnadene pr analyse vil sannsynligvis avta. Innen sekvensering kommer det nye metoder som er raskere og rimeligere (38).



### **”Nye” metoder innen diagnostikk**

Utvikling av mikromatriser (”biochips”) vil gjøre det mulig å identifisere mange mikroorganismer (bakterier, sopp, virus, parasitter), og flere agens kan påvises i samme prøve (f eks aerobe og anaerobe bakterier i abscessmateriale) (39).

Nanoteknologi åpner bl. a. for påvisning av mikroorganismer med meget høy sensitivitet (40).

Ved hjelp av immunogenetikk vil individets mottakelighet for ulike alvorlige infeksjoner sannsynligvis kunne kartlegges.

### **2.6.13 Referanser**

- (1) Villanueva AV, Podzorski RP, Reyes MP. Effects of various handling and storage conditions on stability of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1998 July;36(7):2117-9.
- (2) Nolte FS, Caliendo AM. Molecular Detection and Identification of Microorganisms. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th edition ed. Washington,DC: ASM Press; 2007. p. 218-44.
- (3) Nucleic acid extraction by the Boom method. Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory, Health Protection Agency, UK 2005;VSOP 20.
- (4) Taha MK, Olcen P. Molecular genetic methods in diagnosis and direct characterization of acute bacterial central nervous system infections. *APMIS* 2004 November;112(11-12):753-70.
- (5) Stormer M, Kleesiek K, Dreier J. High-volume extraction of nucleic acids by magnetic bead technology for ultrasensitive detection of bacteria in blood components. *Clin Chem* 2007 January;53(1):104-10.
- (6) Yamamoto Y. PCR in diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002 May;9(3):508-14.
- (7) Dennett C, Klapper PE, Cleator GM, Lewis AG. CSF pretreatment and the diagnosis of herpes encephalitis using the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1991 September;34(1):101-4.
- (8) Poljak M, Seme K, Gale N. Rapid extraction of DNA from archival clinical specimens: our experiences. *Pflugers Arch* 2000;439(3 Suppl):R42-R44.
- (9) Mackay IM. *Real-Time PCR in Microbiology. From Diagnosis to Characterization*. Caister Academic Press; 2007.
- (10) Burkardt HJ. Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin Chem Lab Med* 2000 February;38(2):87-91.
- (11) Jonassen TØ. Nukleinsyreampifikasjonsteknikker - interne prosesskontroller og uavhengige kontroller. In: Jenum PA, Müller F, Tveten Y, editors. *Strategimøte 2006: Kvalitetssikring i bakteriologi*. Folkehelseinstituttet; 2006. p. 67-74.

- (12) Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001 April;39(4):1553-8.
- (13) Tzanakaki G, Tsopanomalou M, Kesanopoulos K, Matzourani R, Sioumalas M, Tabaki A et al. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2005 May;11(5):386-90.
- (14) Raganathan L, Ramsay M, Borrow R, Guiver M, Gray S, Kaczmarek EB. Clinical features, laboratory findings and management of meningococcal meningitis in England and Wales: report of a 1997 survey. *Meningococcal meningitis: 1997 survey report. J Infect* 2000 January;40(1):74-9.
- (15) Kotilainen P, Jalava J, Meurman O, Lehtonen OP, Rintala E, Seppala OP et al. Diagnosis of meningococcal meningitis by broad-range bacterial PCR with cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1998 August;36(8):2205-9.
- (16) Cherian T, Lalitha MK, Manoharan A, Thomas K, Yolken RH, Steinhoff MC. PCR-Enzyme immunoassay for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in cerebrospinal fluid samples from patients with culture-negative meningitis. *J Clin Microbiol* 1998 December;36(12):3605-8.
- (17) Lu JJ, Perng CL, Lee SY, Wan CC. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2000 June;38(6):2076-80.
- (18) Deutch S, Moller JK, Ostergaard L. Combined assay for two-hour identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* and concomitant detection of 16S ribosomal DNA in cerebrospinal fluid by real-time PCR. *Scand J Infect Dis* 2008 February 5;1-8.
- (19) Van GE, Bruynseels P, Verstrepen W, Mertens A. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of pneumococcal and meningococcal meningitis in a tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007 September;26(9):651-3.
- (20) Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol Rev* 2005 November;29(5):851-75.
- (21) Fox AJ, Taha MK, Vogel U. Standardized nonculture techniques recommended for European reference laboratories. *FEMS Microbiol Rev* 2007 January;31(1):84-8.
- (22) Paschoal RC, Hirata MH, Hirata RC, Melhem MS, Dias AL, Paula CR. Neurocryptococcosis: diagnosis by PCR method. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2004 July;46(4):203-7.
- (23) Leal AL, Faganello J, Bassanesi MC, Vainstein MH. *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. *Med Mycol* 2008 June;46(4):377-83.

- (24) Komatsu H, Fujisawa T, Inui A, Horiuchi K, Hashizume H, Sogo T et al. Molecular diagnosis of cerebral aspergillosis by sequence analysis with panfungal polymerase chain reaction. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004 January;26(1):40-4.
- (25) Klingspor L, Jalal S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 2006 August;12(8):745-53.
- (26) Hummel M, Spiess B, Kentouche K, Niggemann S, Bohm C, Reuter S et al. Detection of *Aspergillus* DNA in cerebrospinal fluid from patients with cerebral aspergillosis by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol* 2006 November;44(11):3989-93.
- (27) Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B, Rotter ML, Hirschl AM, Willinger B. Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2007 March;45(3):906-14.
- (28) Tatti KM, Shieh WJ, Phillips S, Augenbraun M, Rao C, Zaki SR. Molecular diagnosis of *Nocardia farcinica* from a cerebral abscess. *Hum Pathol* 2006 August;37(8):1117-21.
- (29) Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ, Jr. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 2006 April;19(2):259-82.
- (30) Thulin S, Olcen P, Fredlund H, Unemo M. Combined real-time PCR and pyrosequencing strategy for objective, sensitive, specific, and high-throughput identification of reduced susceptibility to penicillins in *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 February;52(2):753-6.
- (31) Taha MK, Vazquez JA, Hong E, Bennett DE, Bertrand S, Bukovski S et al. Target gene sequencing to characterize the penicillin G susceptibility of *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 August;51(8):2784-92.
- (32) Kearns AM, Graham C, Burdess D, Heatherington J, Freeman R. Rapid real-time PCR for determination of penicillin susceptibility in pneumococcal meningitis, including culture-negative cases. *J Clin Microbiol* 2002 February;40(2):682-4.
- (33) Harris KA, Turner P, Green EA, Hartley JC. A duplex real-time PCR assay for the detection, and determination of penicillin susceptibility, of *Streptococcus pneumoniae* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2008 June 18.
- (34) Saha SK, Darmstadt GL, Baqui AH, Islam N, Qazi S, Islam M et al. Direct detection of the multidrug resistance genome of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluid of children: implications for treatment of meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 2008 January;27(1):49-53.
- (35) Diggle MA, Clarke SC. Molecular methods for the detection and characterization of *Neisseria meningitidis*. *Expert Rev Mol Diagn* 2006 January;6(1):79-87.

- (36) Woods CR, Koeuth T, Estabrook MM, Lupski JR. Rapid determination of outbreak-related strains of *Neisseria meningitidis* by repetitive element-based polymerase chain reaction genotyping. *J Infect Dis* 1996 October;174(4):760-7.
- (37) Caugant DA. Genetics and evolution of *Neisseria meningitidis*: Importance for the epidemiology of meningococcal disease. *Infect Genet Evol* 2008 April 10.
- (38) Mardis ER. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008 June 19.
- (39) Bryant PA, Venter D, Robins-Browne R, Curtis N. Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2004 February;4(2):100-11.
- (40) Luo PG, Stutzenberger FJ. Nanotechnology in the detection and control of microorganisms. *Adv Appl Microbiol* 2008;63:145-81.

## **2.7 CNS-infeksjoner hos den nevrokirurgiske pasient. Vurdering av funn – signifikante eller ikke?**

*Rune Hennig og Gunnar Skov Simonsen, Universitetssykehuset i Nord-Norge*

Det er ikke bedt om sammendrag fra disse innleggene. De skulle illustrere problemene man daglig møter i vurdering av funn i prøvemateriale fra CNS. Det ble ikke trukket konklusjoner som ikke er dekket i de andre innleggene.

Tidligere rapporter fra:

- Strategimøte nr 1 (1987): *Fæcesdiagnostikk*
- Strategimøte nr 2 (1988): *Næringsmiddelinfeksjoner/intoksikasjoner og Parasittologi*
- Strategimøte nr 3 (1989): *Anaerob diagnostikk*
- Strategimøte nr 4 (1990): *Mykologi*
- Strategimøte nr 5 (1991): *Bakteriologiske og mykologiske undersøkelser i forbindelse med underlivsprøver*
- Strategimøte nr 6 (1992): *Resistensbestemmelse*
- Strategimøte nr 7 (1993): *Bakteriologisk diagnostikk ved urinveisinfeksjon*
- Strategimøte nr 8 (1994): *Mykobakterier*
- Strategimøte nr 9 (1995): *Bakteriologisk diagnostikk ved luftveisinfeksjoner*
- Strategimøte nr 10 (1996): *Bakteriologiske faecesundersøkelser*
- Strategimøte nr 11 (1997): *Bakterielle infeksjoner i hud og bløtdeler*
- Strategimøte nr 12 (1998): *Kravfulle/uvanlige bakterier*
- Strategimøte nr 13 (1999): *Sikkerhetsregler og smitteforebygging i medisinske mikrobiologiske laboratorier*
- Strategimøte nr 14 (2000): *Stafylokokker*
- Strategimøte nr 15 (2001): *Streptokokker*
- Strategimøte nr 16 (2002): *Blodkultur*
- Strategimøte nr 17 (2003): *Nedre luftveisinfeksjoner  
Spesielle kliniske og diagnostiske problemer*
- Strategimøte nr 18 (2004): *Resistensbestemmelse*
- Strategimøte nr 19 (2005): *Mikrobiologisk beredskap*
- Strategimøte nr 20 (2006): *Kvalitetssikring i bakteriologi*
- Strategimøte nr 21 (2007) *Bakteriologisk diagnostikk ved urinveisinfeksjon*

**Ringtester:**

Styremøtet for medisinsk-mikrobiologiske laboratorier i Norge etablerte i 1982 et program for eksterne kvalitetsvurderinger i bakteriologi, mykologi og parasittologi ("ringtester") i Norge.

Ansvar for programmet ble lagt til en Referansegruppe som i dag består av 5 representanter for de deltagende laboratorier. Disse velges for 4 år om gangen. Organiseringen og den praktiske gjennomføringen av programmet ble lagt til en arbeidsgruppe med permanent sete ved Avdeling for bakteriologi, Statens Institutt for Folkehelse

Programmet består av 4 utsendelser pr år som hver vanligvis består av 4 simulerte kliniske materialer med tilhørende kliniske opplysninger. Prøvene sendes ut "åpent", dvs. at deltagerne vet at det dreier seg om en ringtest, men de skal likevel behandle materialene i størst mulig grad som ordinære kliniske prøver. I henhold til egen rutine skal de således gjennomføre isolering, identifikasjon og eventuelt resistensbestemmelse av mulige patogene agens samt vurdere den kliniske betydning av funnet.

Flertallet av materialene representerer vanlige diagnostiske problemer. Enkelte av problemene kan likevel være sjeldne eller vanskelige, idet de er valgt ut med tanke på å minne deltagerne om uvanlige, men likevel viktige kliniske situasjoner eller for å informere dem om f.eks. en aktuell epidemiologisk situasjon, ny viten o.l.

Hver utsendelse avsluttes med en oppsummerende rapport fra arbeidsgruppen.

**Strategimøter:**

Hvert år arrangeres det innen rammen av ringtestprogrammet et strategimøte (tidligere kalt konsensusmøte) hvor et spesifikt tema blir tatt opp til diskusjon.

Ansvarlig arrangør er Referansegruppen. Denne utpeker vanligvis for hvert enkelt møte en programkomitee blant deltagerne som blir ansvarlig for program og gjennomføring av møtet. Deltagere på møtet er én representant for hvert laboratorium som er med i ringtestprogrammet samt enkelte fremtredende klinikere innen det aktuelle området som skal diskuteres. Alle mikrobiologisk relevante aspekter innen det aktuelle temaet diskuteres med tanke på å komme fram til felles aksepterte retningslinjer og prosedyrer.

Hvert strategimøte avsluttes med en rapport hvor premissene og konklusjonene fra diskusjonene nedfelles. Ansvarlig for rapporten er den aktuelle programkomiteen.

Utgitt av Nasjonalt folkehelseinstitutt  
Divisjon for smittevern

Bestilling:  
Nasjonalt folkehelseinstitutt  
Postboks 4404 Nydalen  
0403 Oslo  
Telefon: 21 07 82 00  
Telefaks: 21 07 81 05

ISSN: 0804-8444  
ISBN 978-82-8082-328-1 trykt utgave  
ISBN 978-82-8082-329-8 elektronisk utgave  
Opplag: 60