

STRATEGIRAPPORT

2018

STRATEGIMØTE NR 30, 2016

# Mykobakteriediagnostikk

Programkomité:

Heidi Syre

Astri Lervik Larsen

Anne Torunn Mengshoel (leder)



Strategimøte nr. 30, 2016

# MYKOBAKTERIEDIAGNOSTIKK

26. oktober 2016, kl. 10.00 – 16.00

Gjestehuset Lovisenberg

## *Programkomité*

Heidi Syre, Astri Lervik Larsen, og Anne Torunn Mengshoel (leder)

## **Forord**

Det 30. Strategimøte i regi av Referansegruppen for eksterne kvalitetsvurderinger i bakteriologi, mykologi og parasittologi omhandlet mykobakteriediagnostikk og ble avholdt 26.10.2016 på Gjestehuset Lovisenberg i Oslo. På møtet deltok 38 personer fra landets medisinsk-mikrobiologiske laboratorier.

Ansvarlig programkomité, som også har ferdigstilt denne avsluttende rapporten, var Heidi Syre, Astri Lervik Larsen og Anne Torunn Mengshoel (leder).

Rapporten inneholder sammendrag med anbefalinger, bakgrunnsinformasjon og innleggene som ble holdt på møtet. Sammendrag og anbefalinger er ført i pennen av programkomiteen i forståelse med de ansvarlige for innleggene i etterkant av møtet.

Bakgrunnsinformasjonen er ført i pennen av de ansvarlige for innleggene i forståelse med programkomiteen, og ble sendt ut til deltakerne i forkant av møtet.

Vi håper rapporten blir nyttig for de enkelte laboratoriene.

***Oslo, 12.07.2017***

***For Referansegruppen***

***Martin Steinbakk***



## INNHOLDSFORTEGNELSE

<b>PROGRAM</b> .....	<b>4</b>
<b>DELTAKERE/FOREDRAGSHOLDERE</b> .....	<b>5</b>
<b>1 SAMMENDRAG OG ANBEFALINGER</b> .....	<b>6</b>
1.1 PRØVETAKNING OG FORSENDELSE .....	6
1.2 DIREKTE PÅVISNING AV MYKOBAKTERIER .....	7
1.3 DYRKNING AV MYKOBAKTERIER.....	12
1.4 IDENTIFIKASJON AV MYKOBAKTERIER .....	15
1.5 RESISTENSBESTEMMELSE AV MYKOBAKTERIER .....	18
1.6 MOLEKYLÆREPIDEMIOLOGISK UNDERSØKELSE AV <i>M. TUBERCULOSIS</i> .....	22
1.7 IGRA –INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS.....	22
<b>2 BAKGRUNNSINFORMASJON</b> .....	<b>27</b>
2.1 PRØVETAKING OG FORSENDELSE .....	27
2.2 VURDERING AV EKSPERATORATPRØVER FØR DIAGNOSTIKK AV MYKOBAKTERIER.....	30
2.3 PÅVISNING AV MYKOBAKTERIER VED DIREKTE MIKROSKOPI.....	33
2.4 NUKLEINSYRE AMPLIFIKASJONSTESTER DIREKTE I PRØVEMATERIALET .....	39
2.5 DYRKNING AV MYKOBAKTERIER .....	46
2.6 IDENTIFICATION OF THE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX (MTBC) WITH MPT64-ANTIGEN BASED RAPID TESTS (MPT64 ICTs) .....	53
2.7 IDENTIFISERING AV MYKOBAKTERIER VED HJELP AV MALDI-TOF MASSESPEKTROMETRI .....	57
2.8 IDENTIFIKASJON AV MYKOBAKTERIER MED MOLEKYLÆRE METODER.....	60
2.9 RESISTENSBESTEMMELSE AV MYKOBAKTERIER .....	64
2.10 MOLEKYLÆREPIDEMIOLOGISK UNDERSØKELSE AV <i>M. TUBERCULOSIS</i> .....	77
2.11 IGRA –INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS .....	79
<b>3 INNLEGGENE PÅ MØTET</b> .....	<b>84</b>

## Strategimøte 26. oktober 2016: Mykobakteriediagnostikk Gjestehuset Lovisenberg

Tid	Tema	Innleder
<b>09:30 Fremmøte med kaffe og «noe å bite i»</b>		
10:00	Innledning og velkommen	Heidi Cecilie Villmones, Nestleder for Referansegruppen
10:10	Rutiner på laboratoriene	Anne Torunn Mengshoel, Referanselab. for mykobakterier, Avd. for tuberkulose, blod- og seksuell smitte, FHI
10:25	Prøvetakning og forsendelse	Mogens Jensenius, Infeksjonsmedisinsk avd., OUS
10:40	Vurdering av prøvematerialet før undersøkelse på laboratoriet	Heidi Syre, Avd. for medisinsk mikrobiologi, Helse Stavanger HF
10:50	Spørsmål/Innspill	
<b>11:00 Kaffe med «noe å bite i» (15 min)</b>		
<b>Påvisning av mykobakterier</b>		
11:15	Direkte mikroskopi av syrefaste staver	Astri Lervik Larsen, Senter for laboratoriemedisin, Sykehuset Østfold Kalnes
11:25	NAAT for påvisning av MTBC direkte i prøvematerialet	Heidi Syre, Avd. for medisinsk mikrobiologi, Helse Stavanger HF
11:35	Spørsmål/Innspill	
12:45	Dyrkning av mykobakterier	Tone Tønjum, Avd. for mikrobiologi, OUS
12:05	Spørsmål/Innspill	
<b>12:15 Lunsj (45 min)</b>		
<b>Identifikasjon av mykobakterier</b>		
13:00	MPT64 antigen	Harleen Grewal, Mikrobiologisk avd., Haukeland universitetssjukehus
13:10	Maldi-Tof	André Ingebretsen, Avd. for mikrobiologi og Avd. for smittevern, OUS
13:25	Molekylære metoder	Mona Holberg-Petersen, Seksjon for utvikling, Avd. for mikrobiologi, OUS
13:40	Spørsmål/Innspill	
<b>Resistensbestemmelse av mykobakterier</b>		
13:50	Resistensbestemmelse MTBC og NTM	Anne Torunn Mengshoel, Referanselab. for mykobakterier, Avd. for tuberkulose, blod- og seksuell smitte, FHI
14:10	Spørsmål/Innspill	
<b>14:20 Kaffe med «noe å bite i» (15 min)</b>		
14:35	Molekylær epidemiologisk undersøkelse	Vegard Eldholm, Avd. for molekylærbiologi, FHI
14:50	Spørsmål/Innspill	
15:00	IGRA	Anne-Marte Bakken Kran, Avd. for mikrobiologi, OUS
15:15	Spørsmål/Innspill	
15:25	Oppsummering og avslutning	Programkomiteen
<b>15:45 Slutt</b>		

**Strategimøte 26. oktober 2016: Mykobakteriediagnostikk**

<b>Foredragsholdere/ møteledere</b>	<b>Institusjon/sykehus</b>	<b>Funksjon</b>
Bakken Kran, Anne-Marte	Oslo Universitetssykehus/UIO	Innleder
Eldholm, Vegard	Folkehelseinstituttet	Innleder
Grewal, Harleen	Haukeland Universitetssykehus	Innleder
Holberg-Petersen, Mona	Oslo Universitetssykehus	Innleder
Ingebretsen, Andre	Oslo Universitetssykehus - Rikshosp.	Innleder
Jenseniussen, Mogens	Oslo Universitetssykehus	Innleder
Larsen, Astri Lervik	Sykehuset Østfold	Innleder/møteleder
Mengshoel, Anne Torunn	Folkehelseinstituttet	Innleder/møteleder
Syre, Heidi	Stavanger Universitetssykehus	Innleder/møteleder
Tønjum, Tone	Oslo Universitetssykehus/UIO	Innleder/representant
<b>Øvrige deltakere</b>		
Bergh, Kåre	Str. Olavs hospital	Representant
Bergom, Stine Botten	Sykehuset Innlandet - Lillehammer	Observatør
Dedi, Lumnije	Oslo Universitetssykehus - Ullevål	Representant
Dons, Tine Nilsen	Sykehuset Innlandet - Lillehammer	Representant
Drægni, Linn	Bærum sykehus	Observatør
Espvik, Heidi Johanne	Akershus universitetssykehus	Observatør
Feruglio, Siri Laura	Folkehelseinstituttet	Observatør/referansgr.
Gaustad, Peter	Fürst medisinske laboratorium	Representant
Handal, Nina	Akershus universitetssykehus	Representant
Hillestad, Paula	Folkehelseinstituttet	Observatør
Hjetland, Reidar	Førde Sentralsykehus	Representant
Holter, Jan Cato	Oslo Universitetssykehus - Ullevål	Observatør
Høie, Mina Øydis	Bærum sykehus	Representant
Jakobsen, Finn Bjørnar	Oslo Universitetssykehus - Ullevål	Observatør
Johal, Simreen Kaur	Nordlandssykehuset	Observatør
Kittang, Gunnhild Osnes	Stavanger Universitetssykehus	Observatør
Nilsen, Hans-Johnny Schjelderup	St. Olavs hospital	Observatør
Olsen, Karina	Universitetssykehuset Nord-Norge	Representant
Raffelsberger, Niclas	Universitetssykehuset Nord-Norge	Observatør
Skarstein, Ingerid	Haukeland Universitetssykehus	Representant
Steinbakk, Martin	Folkehelseinstituttet	Arbeidsutvalget, referansegr.
Szpinda, Irena	Oslo Universitetssykehus - Rikshosp.	Observatør
Sønstebo, Liv Jorunn	Haugesund sjukehus Fonna	Representant
Tofteland, Ståle	Sørlandet Sykehus Kristiansand	Representant
Tveten, Yngvar	Sykehuset Telemark	Representant
Villmones, Heidi Cecilie	Sykehuset Vestfold	Representant/leder referansegr.
Vu, Ba Ngoc	Haukeland Universitetssykehus	Observatør
Wågø, Anne Grete	St. Olavs Hospital	Observatør
Åsheim, Sandra	Nordlandssykehuset	Representant

# 1 SAMMENDRAG OG ANBEFALINGER

## 1.1 Prøvetaking og forsendelse

Ved mistanke om infeksjon forårsaket av mykobakterier er isolering og identifisering av den aktuelle mykobakteriearten viktig. Prøver til mykobakteriediagnostikk skal tas før oppstart av en eventuell empirisk behandling, slik at denne senere kan modifiseres basert på identifikasjon og resistensundersøkelse. Viktige faktorer for god diagnostikk er optimal prøvetaking, stort nok prøvevolum, samt korrekt transport og oppbevaring. De fleste prøvematerialer transporteres til laboratoriet i sterile beholdere uten tilsetning, se tabeller under for detaljert informasjon. Ved søl (særlig aktuelt ved luftveisprøver) må prøveglasset tørkes på utsiden med godkjent desinfeksjonsmiddel (Perasafe) før transport. Det er viktig med gode kliniske opplysninger på rekvisisjonen.

Prøvene må sendes raskest mulig til laboratoriet, og må ikke utsettes for dagslys eller UV-stråling. Hvis prøven ikke kan sendes i løpet av en time, bør den settes i kjøleskap. Unntak er blodkultur og beinmargaspirat som skal oppbevares i romtempertur. Tid fra prøvetaking til undersøkelse i laboratoriet bør helst ikke overstige 3-4 døgn.

Ikke sterile prøvematerialer	Prøvetaking	Kommentar
Ekspektorat	Helst fastende morgenprøve. Trekk pusten dypt flere ganger og host direkte i prøveglasset. Eventuelt kan pasienten hvile på forhånd med syk side opp eller få assistanse fra fysioterapeut. Minst 3-5 ml i steril beholder uten tilsetning.	Sensitivitet ved dyrkning av 1 prøve er ca. 85%, ved 2 prøver ca. 94% og ved 3 prøver ca. 97%. Ta minst 2 prøver av god kvalitet på 2 ulike dager.
Indusert sputum	Helst fastende morgenprøve. Inhalasjon av hypertont (3%) sterilt saltvann via forstøverapparat. Pasient må kunne samarbeide. Minst 3-5 ml i steril beholder uten tilsetning. Personale må bruke åndedrettsvern. Prosedyren bør skje i rom med undertrykksventilasjon, og helst med mulighet for UVC-bestråling etter prosedyren.	Gir bedre prøvemateriale fra nedre luftveier enn ekspektorat. Også egnet for kontroll av behandling. Ta minst 2 prøver av god kvalitet på 2 ulike dager.
Bronkialskyllvæske (BAL)	Instillasjon av 10-50 ml sterilt fysiologisk saltvann fulgt av aspirasjon via bronkoskop.	Aktuelt hvis pasienten ikke kan produsere ekspektorat eller ta indusert sputum, eller hvis slike prøver er negative til tross for begrunnet mistanke om infeksjon.
Ventrikkelaspirat	Fastende morgenprøve. Mageinnholdet aspireres i en 50 ml sprøyte og overføres til en steril beholder uten tilsetning. 50-75 ml sterilt vann (ikke saltvann) settes ned på sonden, deretter aspireres mageinnholdet på nytt. Dette aspiratet tilsettes det første. Oppsamlet væske nøytraliseres med natriumbikarbonat-løsning (0,5 mmol/ml) til pH ca 7 (sjekkes med urinstix).	Ved mistanke om pulmonal infeksjon hos pasient som ikke kan ta sputumprøve. Eksempler er yngre barn og eldre, skrøpelige pasienter som ikke samarbeider og/eller ikke tåler indusert sputum eller bronkoskopi. Ta helst 3 prøver på 3 ulike dager.
Urin	Morgenurin, midtstrømsprøve. 50-100 ml i steril beholder uten tilsetning.	Ved mistanke om urogenital eller miliær infeksjon. Ta helst 3 prøver på 3 ulike dager.
Avføring	Minst 1 gram i steril beholder uten tilsetning.	Ved mistanke om intestinal infeksjon. Påvisning i avføring har lav sensitivitet, tarmbiopsi anbefales. Dyrkning av avføring kan ha verdi ved mistanke om MAC-infeksjon hos AIDS-pasienter. Ta helst 3 prøver på 3 ulike tidspunkt.
Overfladisk puss og sekret	Rikelig materiale i steril beholder uten tilsetning (evt penselprøve i Amies transportmedium hvis annet ikke er mulig).	Penselprøve gir lavt prøvevolum og har lav sensitivitet.

Sterile prøvematerialer	Prøvetaking	Kommentar
Spinalvæske	Så mye materiale som mulig, minst 2 ml. Steril beholder uten tilsetning.	Økt prøvevolum gir økt sensitivitet. Om mulig er 8-10 ml ønskelig.
Pleuravæske, ascitesvæske, leddvæske, perikardvæske	Så mye prøvemateriale som mulig. Steril beholder uten tilsetning. For prøver som kan koagulere, bør det ved prøvetakning tilsettes antikoagulantia (kalium oxalat 0.01-0.02 ml 10% oxalat per ml væske, heparin 0.2 mg/ml eller natrium-citrat 2 dråper 20% natrium-citrat per 10 ml væske).	Biopsier fra infeksjonsfokus gir høyere sensitivitet enn dyrking fra kroppsvæsker.
Vevsprøver/biopsi	Så mye materiale som mulig. Bruk aseptisk teknikk. Steril beholder med litt fysiologisk saltvann for å forhindre inntørking.	
Puss fra dyp abscess	Så mye materiale som mulig. Steril beholder uten tilsetning. Eventuelt aspirert abscessinnhold i plombert sprøyte med godt sikret stempel.	

Blodmaterialer	Prøvetaking	Kommentar
Veneblod	Spesialflasker for mykobakterier til blod. 3-10 ml blod overføres til flaskene. Oppbevares i romtemperatur.	Ved mistanke om systemisk infeksjon, f eks miliær TB eller disseminert MAC-infeksjon hos immunsupprimerte. Alternativ til spesialflasker er lysis sentrifugering (Isolator blodkultursystem).
Beinmargaspirat	Spesialflasker for mykobakterier til blod. Minst 3 ml aspirat overføres fra sprøyte til spesialflasker. Oppbevares i romtemperatur.	

### 1.1.1 Vurdering av ekspektoratprøver før diagnostikk av mykobakterier

Prøvekvaliteten er avgjørende for god diagnostikk. Det anbefales at ekspektoratprøver vurderes makroskopisk av laboratorieansatte med tanke på kvalitet. Ved dårlig prøvekvalitet bør dette rapporteres på svarbrevet og rekvirenten bør oppfordres til ny prøve dersom det er mistanke om aktiv lungetuberkulose. Allikevel bør prøver ikke avvises av denne grunn.

Klinisk personell bør læres opp i undersøkelse av prøvekvalitet slik at det unngås å sende prøver av dårlig kvalitet til laboratoriet. Rekvirent bør vurdere prøvekvaliteten makroskopisk umiddelbart etter prøvetakning og eventuelt ta ny prøve. Mukoide og purulente prøver regnes å være av god kvalitet, mens prøver med vandig utseende (indikasjon på tilblending av mye spytt fra munnhule) er av dårlig kvalitet.

Pasienten bør også informeres om betydning av riktig prøvemateriale før prøvetakning.

## 1.2 Direkte påvisning av mykobakterier

### 1.2.1 Direkte mikroskopi

#### 1.2.1.1 Anbefalt metode

To metoder er tilgjengelige; undersøkelse av Ziehl-Neelsen(ZN)-farget preparat med lysmikroskop, og fluorescensmikroskopi av auramin-farget preparat (IF). ZN er enklere å lære, men IF-metoden regnes som ca 10 % mer sensitiv og mindre arbeidskrevende. I nyere publikasjoner vurderes spesifisiteten som lik for de to metodene.

Laboratorier som baserer seg på mikroskopi som primær diagnostikk bør benytte fluorescensmikroskopi av auramin-farget preparat. ZN-metode er fortsatt et godt alternativ.

Auramin-metoden kan være vanskelig å lære seg, og laboratorier som skal gå over fra ZN-metode til auramin må gjøre en grundig validering før endringen innføres.

#### 1.2.1.2 Bruk av kvalitetskontroll

Laboratoriene bør som et minimum benytte kvalitetskontroll når ny batch av fargereagens tas i bruk. Resultatene bør loggføres. Alle laboratorier som utfører mikroskopi bør dessuten delta i eksternt kvalitetssikringsprogram.

#### 1.2.1.3 Direkte mikroskopi før eller etter forbehandling?

Mikroskopi bør utføres på forbeholdt materiale. Dette er i samsvar med de fleste internasjonale retningslinjer.

#### 1.2.1.4 Skal cytospin benyttes?

Preparater laget med cytospin er ofte lettere å mikroskopere, men det foreligger ikke tilstrekkelig dokumentasjon på om cytospin gir bedre sensitivitet enn preparat laget ved utstryk.

#### 1.2.1.5 Prøvepreparering uten P3 fasiliteter

Laboratorier som ikke har inneslutningsnivå 3 kan likevel etter risikovurdering utføre mikroskopi av prøvematerialet. Dette forutsetter at all håndtering av prøvematerialet forgår i biologisk sikkerhetskabinett.

#### 1.2.1.6 Antall synsfelt som bør undersøkes

Strategimøtet velger å slutte seg til anbefalingene fra ECDC

(<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/handbook-tb-laboratory-diagnostic-methods-european-union>). 100 synsfelt ved ZN-metode, omtrent 5 minutters tidsbruk per preparat virker fornuftig. Ved IF mikroskopi vil 30 og 40 synsfelt være tilstrekkelig, med bruk av henholdsvis 20- og 40-linse (som gir hhv. 200 X og 400 X forstørrelse).

### 1.2.1.7 Hvordan skal funnet kvantiteres?

Anbefalingen fra ECDC er gjengitt under. Det er en fordel at kvantiteringen er standardisert, både for sammenligning laboratorier imellom, og ved deltakelse i europeiske kvalitetskontroller.

<b>ZN (100-linse; 1000 X forstørrelse)</b> <b>Antall syrefaste staver</b>	<b>IF (20-linse, 200 X forstørrelse)</b> <b>Antall syrefaste staver</b>	<b>IF (40-linse, 400 X forstørrelse)</b> <b>Antall syrefaste staver</b>	<b>Resultat</b>
0 per 100 synsfelt	0 per 30 synsfelt	0 per 40 synsfelt	Syrefaste staver ikke påvist
1-9 per 100 synsfelt	1-29 per 30 synsfelt	1-19 per 40 synsfelt	Sparsomt, angi antall
10-99 per 100 synsfelt	30-299 per 30 synsfelt	20-199 per 40 synsfelt	1+
1-10 per synsfelt (minst 50 felt)	10-100 per synsfelt i gjennomsnitt	5-50 per synsfelt i gjennomsnitt	2+
>10 per synsfelt (minst 20 felt)	>100 per synsfelt i gjennomsnitt	>50 per synsfelt i gjennomsnitt	3+

### 1.2.1.8 Rapportering av resultat på prøvesvar

Funnet bør kvantiteres og antall syrefaste staver per synsfelt bør angis.

### 1.2.1.9 Hvilke prøvematerialer bør rutinemessig mikroskoperes?

Luftveismateriale fra pasienter med mistanke om smittsom lungetuberkulose bør mikroskoperes. Urinprøver bør ikke mikroskoperes. Mikroskopi av sterile kroppsvæsker og vevsprøver er lite sensitivt, men bør vurderes hos pasienter med sterk mistanke om mykobakterieinfeksjon. Mikroskopi av blodig materiale er lite sensitivt. (Anbefalingen gjelder for laboratorier som benytter mikroskopi som primærmetode for direktepåvisning)

#### 1.2.1.10 Retningslinjer for isolering

I henhold til Tuberkuloseveilederen (<https://www.fhi.no/nettpub/tuberkuloseveilederen/>) kan isolering oppheves dersom tre sputumprøver eller en BAL er negativ ved direkte mikroskopi (dersom det ikke er mistanke om multiresistent tuberkulose). WHO anbefaler imidlertid nå at antallet sputumprøver reduseres til to. WHO skriver i sin rapport (19, avsnitt 3.3) at grundig mikroskopi av to sputumprøver identifiserer 95-98% av mikroskopi-positive pasienter. ECDC (<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/handbook-tb-laboratory-diagnostic-methods-european-union>) skriver i sine anbefalinger at minst 2 prøver bør undersøkes.

Tuberkulosekomiteen bør vurdere om nasjonale anbefalinger skal endres i tråd med anbefalingene fra WHO og ECDC. En eventuell anbefaling om at to prøver er tilstrekkelig forutsetter at prøvematerialet er av god nok kvalitet, og at laboratoriene gir tilbakemelding til sine rekvirenter ved dårlig prøve kvalitet.

## 1.2.2 Nukleinsyre amplifikasjonstester direkte i prøvematerialet

### 1.2.2.1 Sensitivitet og spesifisitet

Nukleinsyre amplifikasjonstester (NAAT) har høyere sensitivitet enn mikroskopisk undersøkelse og gir et vesentlig raskere testresultat enn dyrkning. De fleste av dagens kommersielt tilgjengelige tester for påvisning av *M. tuberculosis* komplekset (MTBC) er kun godkjente for prøver fra nedre luftveier. For mikroskopi-positive, dyrknings-positive ekspektoratprøver er sensitiviteten til NAAT for påvisning av MTBC høy (>95 %). For mikroskopi-negative, dyrknings-positive prøver er sensitiviteten lavere. Sensitiviteten er også lavere i ekstrapulmonale prøver og varierer avhengig av type prøvemateriale. Et negativt testresultat i NAAT utelukker ikke tilstedeværelsen av MTBC og prøven må alltid dyrkes i tillegg. Spesifisiteten for direkte NAAT er høy i alle typer prøver (92-99 %). Til tross for høy spesifisitet vil falskt positive testresultater forekomme, og for å minimere risikoen er det viktig at analysen ikke utføres uten at det foreligger en reell pretest sannsynlighet for tuberkulose (TB).

### 1.2.2.2 Antall prøver som bør undersøkes ved NAAT

De ulike laboratoriene i Norge har ulik tilgang til NAAT for påvisning av MTBC. Noen laboratorier bruker primært NAAT for hurtig påvisning av MTBC, andre laboratorier bruker primært mikroskopisk undersøkelse. Laboratorier som bruker NAAT til primærdiagnostikk bør rutinemessig utføre NAAT på minst 2 ekspektoratprøver fra pasienter med symptomer på lunge-TB hvor diagnosen er mistenkt, men ikke bekreftet, og hvor testresultatet vil føre til endring i behandling eller smitteverntiltak. Det bør gjøres direkte mikroskopisk undersøkelse på alle NAAT-positive ekspektoratprøver for å vurdere smittsomhet. Studier viser at samlet sensitivitet for to ekspektoratprøver er noe høyere ved NAAT enn for en prøve, mens analyse av en tredje prøve gir lite økning i sensitivitet. Det forutsettes at ekspektoratprøvene er av god kvalitet. I anbefalingene skiller det ikke mellom ekspektoratprøver og indusert sputum.

For laboratorier som primært bruker mikroskopisk undersøkelse for hurtig påvisning av MTBC, bør NAAT rutinemessig utføres på minst en mikroskopi-positiv ekspektoratprøve for å utelukke NTM («non-tuberculouse mycobacteria»). Ved tre mikroskopi-negative ekspektoratprøver, men likevel høy mistanke om lunge-TB, bør det vurderes å gjøre NAAT på en ekspektoratprøve for å få en tidlig diagnose. Ved mistanke om multiresistent (MDR) lunge-TB eller lunge-TB ved HIV-TB ko-infeksjon, bør NAAT rutinemessig utføres på minst en ekspektoratprøve. Ved mistanke om MDR-TB bør NAAT som inkluderer påvisning av mutasjoner assosiert med rifampicin-resistens utføres.

Siden ekstrapulmonal-TB ikke er smittsom og dagens NAAT ikke er godkjente for ekstrapulmonalt prøvemateriale, er det ikke et krav at ekstrapulmonale prøver rutinemessig blir undersøkt med NAAT. Hvorvidt det bør gjøres NAAT avhenger av flere faktorer, blant annet pretest sannsynlighet for TB, alvorlighetsgrad av symptomer og immunstatus. For rask avklaring bør det gjøres NAAT på spinalvæsker fra pasienter med mistenkt TB meningitt.



Spinalvæsker bør oppkonsentreres før analyse dersom det er nok prøvevolum. Ved lavt prøvevolum og alvorlig klinikk bør NAAT prioriteres før mikroskopisk undersøkelse, men dyrkning må tilstrebes for sikker identifikasjon og resistensbestemmelse.

Ved negative NAAT-resultater bør det gis et forbehold i svar til rekvirent om at det ikke utelukker tilstedeværelse av MTBC i prøven. Prøven bør alltid dyrkes selv om NAAT utføres. Dyrkning er referansem metode for påvisning av MTBC og nødvendig for resistensbestemmelse og genotyping. Alle laboratorier som utfører dyrkning med tanke på mykobakterier bør også utføre NAAT for påvisning av MTBC for å ha et helhetlig diagnostisk tilbud.

### 1.2.2.3 Preparering av prøve for NAAT og sikkerhet i laboratoriet uten inneslutningsnivå 3

Minimum sikkerhetstiltak ved preparering av kliniske prøver for NAAT er arbeid i sikkerhetskabinett i laboratorium med inneslutningsnivå 2 forutsatt at sikkerhetskabinettet er velfungerende og blir kontrollert regelmessig. Det enkelte laboratoriet må gjøre en egen risikovurdering av prosedyrene ved preparering, særlig med tanke på risiko for aerosoldannelse, og utføre sikkerhetstiltak som er tilpasset de enkelte prosedyrene.

### 1.2.2.4 Antall prøver nødvendig for avisolering av pasient med mistenkt lunge-TB

I følge Tuberkuloseveilederen kan isolering oppheves dersom 3 ekspektoratprøver eller en BAL er negativ ved direkte mikroskopi, dersom det ikke er mistanke om MDR-TB. Siden testresultat ved NAAT kan foreligge kun timer etter prøvetakning og fordi sensitiviteten ved NAAT er høy, er det diskutert om gjeldende retningslinjer for avisolering er optimale. Flere studier har vist at NAAT utført på en eller to ekspektoratprøver har samme eller høyere sensitivitet og negativ prediktiv verdi sammenlignet med mikroskopisk undersøkelse av tre prøver, for påvisning av MTBC i dyrknings-positive prøver. Et negativt NAAT-resultat gir en negativ prediktiv verdi for fravær av syrefaste staver ved mikroskopi ved dyrknings-positiv TB på 99.7 %. NAAT-analyse av to prøver gir en negativ prediktiv verdi på 100 %. Strategimøtet anbefaler derfor at avisolering kan vurderes hos pasienter med mistenkt, men ikke påvist lunge-TB, når to ekspektoratprøver eller en BAL er negativ i NAAT. Tuberkulosekomiteen bør vurdere om nasjonale anbefalinger bør endres for en mer optimal bruk avressurser. Anbefalingen forutsetter at prøvene er av god kvalitet, og gjelder kun for avisolering av personer med mistenkt TB. For pasienter med påvist TB skal avgjørelsen om oppheving av smitteverntiltak baseres på resultat fra mikroskopisk undersøkelse, klinisk vurdering og resultat av resistensbestemmelse.

### 1.2.2.5 Positiv prediktiv verdi og svar til rekvirent ved positivt resultat i NAAT

Til tross for høy spesifisitet ved NAAT for påvisning av MTBC, vil det forekomme falskt positive resultater. Positiv prediktiv verdi avhenger av prevalensen av TB i populasjonen som undersøkes. Det er derfor viktig å kun utføre NAAT på pasienter med en reell pretest sannsynlighet for TB slik at risikoen for falskt positive resultater reduseres. Ved MTBC påvist direkte i prøvematerialet ved NAAT er det ikke nødvendig at svarbrevet til rekvirent kommenteres med at positivt resultat må bekreftes med dyrkning. Anbefalingen forutsetter at kun prøver fra pasienter med reell mistanke om TB testes. Det anbefales at positive resultater i NAAT meldes MSIS.

### 1.2.2.6 Påvisning av NTM direkte i prøvematerialet ved hjelp av NAAT

De finnes få publikasjoner hvor det er utført NAAT for identifikasjon av NTM på species-nivå direkte i prøvematerialet. Noen av studiene viser lovende resultater, men de fleste studier er små og av varierende kvalitet. Flere studier må til før det kan gis anbefalinger på dette området. Det kreves derfor ikke rutinemessig påvisning av NTM direkte i prøvematerialet ved hjelp av NAAT.

## 1.3 Dyrkning av mykobakterier

Håndtering av kulturer som kan inneholde mykobakterier som inngår i *M. tuberculosis*-komplekset (MTBC), må foregå i et sikkerhetskabinett i inneslutningsnivå 3.

Dyrkning av mykobakterier har en nedre deteksjonsgrense på cirka 10 bakterier/ml og er generelt sett mer sensitiv enn direkte påvisning ved mikroskopi eller MTBC-spesifikke NAAT, med unntak av NAAT i direkte mikroskopi positive luftveisprøver fra voksne, der sensitiviteten er 96-98% sammenlignet med dyrkning. Dyrkning anbefales utført for alle prøver og muliggjør identifikasjon til artsnivå, fullstendig resistens-bestemmelse og genotyping av MTBC-isolater. Dyrkning er i tillegg viktig for å kunne avdekke behandlingssvikt.

Mykobakteriene har lang replikasjonstid og spesielle vekstkrav i forhold til andre bakterier. De forskjellige mykobakterie-artene har ulike temperaturoptimum og generasjonstider.

### 1.3.1 Preparering og forbehandling av prøven

De fleste kliniske prøver (alle respiratoriske og mange av de ekstrapulmonale) er kontaminert med normalflora og må dekontamineres før utsæd. Prøver fra normalt sterile områder som er tatt aseptisk, bør ikke dekontamineres.

Den vanligste dekontamineringsmetoden er N-acetyl-L-cysteine natrium hydroxid 2% (NALC-NaOH 2%), som lar seg kombinere med NAAT og dyrkning i systemene med flytende medium. Ved å kombinere NALC (bryter ned organisk materiale) og NaOH (hemmer vekst av normalflora) med homogenisering og sentrifugering, blir mykobakteriene først jevnt fordelt i løsningen og deretter konsentrert ved sentrifugering. NALC-NaOH-løsningen må være fersk og lages daglig og angitt tid for NALC-NaOH-behandling må overholdes strengt, slik at flest mulig mykobakterier overlever.

Andre dekontamineringsmetoder som for eksempel oxalsyre, laurylsulfat (LS) eller klorhexidin, kan være aktuelle hvis prøven inneholder mange andre og/eller resistente bakterier. Oxalsyre lar seg kombinere med dyrkning i flytende medium, i motsetning til LS og klorhexidin, som heller ikke lar seg kombinere med NAAT. Eventuelt kan en NALC-NaOH-løsning med høyere % NaOH benyttes. Ved stort prøvolum (>10 ml) bør prøven konsentreres ved sentrifugering før dekontaminering og det er viktig å benytte tilstrekkelig høy sentrifugeringshastighet (min 3000 RCF (relative centrifugal force)).

Biopsier må homogeniseres mekanisk før dekontaminering, og andre cellerike prøvematerialer bør gjennomgå en nedbrytning eventuelt i kombinasjon med dekontaminering.

Evaluering av kontaminasjonsrate bør utføres hver 3.-6. måned for å kvalitetssikre dekontamineringsprosessen. En kontaminasjonsrate på 3–5% anses som en god balanse mellom behovet for å kvitte seg med kontaminanter og beholde flest mulig mykobakterier viable. En kontaminasjonsrate på 0–1 % indikerer for hard dekontamineringsprosess.

### 1.3.2 Medier

Alle prøver bør dyrkes på flytende medium. Den mest utbredte utstyrsmodellen for dyrkning i flytende medium er det semi-automatiske systemet BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, BD). Andre automatiserte systemer er ESP Culture System II (Trek Diagnostic Systems) og MB/BacT (bioMérieux). Alle disse dyrkningsrørene inneholder Middelbrook 7H9 buljong som tilsettes vekstfaktorer og antibiotika.

Av de faste mediene er Løwenstein-Jensens (LJ) det klassiske egg-baserte mediet, mens de vanligste agarbaserte er Middlebrook 7H10 og 7H11. Både de egg- og agarbaserte mediene har sine fordeler og ulemper. Agarbaserte medier er mindre utsatt for kontaminasjon enn LJ og gjør det lettere å observere vekst og kolonimorfologi. Begge medietyper kan tilsettes ulike supplement og være med eller uten antibiotika. LJ tilsatt glycerol (LJ-G) fremmer vekst av *M. tuberculosis*, mens tilsetning av pyruvat fremmer vekst av *M. bovis* (forekommer sjelden i Norge). Middlebrook 7H11 fremmer vekst av isoniazid-resistente og MDR-TB stammer. På faste medier kan blandingskulturer og kontaminanter lettere oppdages enn i flytende medier.

Automatisert dyrkning i flytende medier gir raskere deteksjon av vekst og høyere isoleringsrate enn dyrkning på faste medier. En kombinasjon av NAAT med både flytende og fast medium gir aller høyest sensitivitet. Det var imidlertid ikke konsensus på strategimøtet om at denne strategien er kostnadseffektiv for alle typer prøvematerialer, spesielt ikke luftveisprøver. Denne vurderingen må gjøres lokalt på hvert laboratorium. Alle prøver fra sterile områder (sterile væsker, biopsier etc) dyrkes parallelt på flytende og fast medium, og det bør inkluderes et ikke-selektivt medium, for eksempel 7H10/7H11-skål eller LJ-G. Et større volum av prøven sås da ut for å øke sensitiviteten.

Noen non-tuberkuløse mykobakterier (NTM)-arter er spesielt kravfulle og har behov for tilsetning av jern (*M. haemophilum* og *M. genavense*). For halscyster og hudbiopsier anbefales derfor jernholdig medium (7H9/7H10/LJ) med 0.5 ml jernholdig supplement eller sjokoladeagarskål på 30°C, i tillegg til mediene ved 37°C. *M. haemophilum*-infeksjon sees spesielt hos immunsupprimerte pasienter og ved dyrkning av prøver fra disse pasientene, bør man tilsette jern.

Subkultur fra flytende til fast medium (både et selektivt for mykobakterier og et generelt bakteriologisk) er alltid nødvendig, for å kunne detektere blanding av mykobakterier og eventuelt kontaminasjon av andre bakterier.

### 1.3.3 Inkuberingslengde

Minimum 6 uker inkubasjon i flytende medium er nødvendig for at en prøve kan rapporteres som negativ, mens faste medier rutinemessig inkuberes i 8 uker før de kan svares som negative og i 12 uker for utvalgte prøver med mistanke om noen spesielt langsomtvoksende mykobakterier.

Hvis syrefaste staver/mykobakterier er påvist direkte i prøvematerialet (ved NAAT eller direkte mikroskopi) uten vekst etter vanlig inkubasjonstid, bør inkubasjonstiden forlenges. Det er imidlertid viktig å følge opp vekst versus positive funn ved direkte påvisning på et tidlig stadium (for eksempel etter 2 uker), slik at man kan optimalisere vekstforhold, spesielt dersom pasienten allerede hadde fått antibiotika ved prøvetaking.

*M. malmoense*, *M. genavense* og *M. ulcerans* er arter som vokser sakte. Ved mistanke om Buruli ulcer med *M. ulcerans* bør inkubasjonstiden forlenges til 12-42 uker (sjelden i Norge).

Kulturer på faste medier bør inkuberes i en skrå posisjon med løs kork i en uke inntil inokulatet er godt absorbert i mediet. Kulturene undersøkes første gang 48 timer etter utsæd for å påvise tidlige kontaminanter (dekonatminering av kulturen er da aktuelt), deretter bør kulturene inspiseres ukentlig.

### 1.3.4 Temperatur

Prøvene inkuberes rutinemessig ved 35–37 °C, mens prøver fra hud og bløtdelsinfeksjoner, eventuelt også fra bein og leddinfeksjoner med utgangspunkt i overfladiske strukturer, inkuberes i tillegg ved lavere temperatur (25–32 °C). Flere NTM (for eks *M. marinum*, *M. chelonae*, *M. haemophilum* og *M. ulcerans*) som kan gi infeksjonssykdom i disse lokalisasjonene har et lavere temperatur-optimum enn de fleste andre mykobakterier.

### 1.3.5 Kvalitetstesting

Kvalitetstesting av medier, mhp sterilitet, vekst og selektivitet utføres med følgende stammer som positive kontroller (for eksempel hver 6 mnd): *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177), *M. kansasii* ATCC 12478, *M. scrofulaceum* ATCC 19981, *M. intracellulare* ATCC 13950 og *M. fortuitum* ATCC 2841, og *Escherichia coli* ATCC 25922 som negativ kontroll.

### 1.3.6 Undersøkelse av positive kulturer

Veksten registreres semi-automatisert eller manuelt, og kulturen vurderes makroskopisk. Er veksten i det flytende mediet blakket eller fnokket (typisk for mykobakterievekst)? På fast medium kan kolonimorfologien og fotoreaktivitet vurderes. Mikroskopi av kulturen er avgjørende for å bekrefte (eller avkrefte) at det er vekst av syrefaste stavbakterier og for å se etter "cord-faktor" (parallell sammenklumping som «strenger»), som er karakteristisk for artene i *M. tuberculosis*-komplekset. Ved mikroskopi og dyrkning på non-selektivt medium utelukkes det at kulturen er forurenset av andre bakterier. Videre identifikasjon gjøres ved påvisning av MPT64 antigen, massespektrometri og/eller ved molekylære metoder (NAAT). Alle mykobakterie-isolater sendes til nasjonalt referanselaboratorium ved FHI.

### 1.3.7 Ekstern kvalitetskontroll

Laboratorier som dyrker prøver med hensyn på mykobakterier må delta i eksterne nasjonale/internasjonale system for kvalitetskontroller.

## 1.4 Identifikasjon av mykobakterier

### 1.4.1 MPT64-antigen baserte tester

De immunkromatografiske MPT64-antigen baserte testene påviser proteinet MPT64 som produseres spesifikt av MTBC under vekst. Metaanalyse (Yin X et al 2013, A.J. Brent et al 2011) viser at testene har høy sensitivitet og spesifisitet for påvisning av MTBC i kultur både i flytende og på fast medium. Falskt negative testresultat kan forekomme ved mutasjoner eller delesjon i *mpt64* genet og ved lav konsentrasjon av MPT64 i unge kulturer. Falskt positive testresultat er rapportert ved vekst av *M. marinum*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. gastri* og *S. aureus*. Testen er enkel å utføre, gir resultat i løpet av minutter og har relativt lave kostnader.

Laboratorier som dyrker mykobakterier bør gjøre MPT64 antigen-test for rask identifikasjon av MTBC i positive kulturer i faste og flytende medier. Testen må gjøres i kombinasjon med makroskopisk og mikroskopisk vurdering av kulturen, for å utelukke vekst av andre bakterier og for å bekrefte karakteristisk MTBC morfologi som cord-dannelse. Kulturen skal sendes referanselaboratorium for bekreftende identifikasjonstester.

### 1.4.2 MALDI-TOF massespektrometri

De senere årene har identifikasjon av mikroorganismer ved hjelp av massespektrometri erstattet mange av de eldre, fenotypiske identifikasjonstestene. Dette gjelder imidlertid i mindre grad for mykobakterier. *M. tuberculosis*-komplekset er et P3 agens og identifikasjon gjøres raskt og enkelt ved annen metodikk (påvisning av MPT64 antigen), dessuten kreves det en omfattende proteinekstraksjonsmetode for mykobakterier generelt. Mangel på en felles standard identifikasjonsprosedyre for mykobakterier har resultert i mange varianter av metoden, men de har alle tre trinn felles: (A) Inaktivering, (B) cellelysering og (C) proteinekstraksjon. Det er viktig å få validert inaktiveringmetode for mykobakteriene før de flyttes ut fra P3-laboratoriet. For å oppnå best mulig identifikasjon er det avgjørende at man bruker tilnærmet lik ekstraksjonsmetode som er brukt for å bygge opp spekterbiblioteket. De ulike leverandørene har utviklet egne metoder som er grunnlaget for eget bibliotek.

Det er rapportert dårligere identifikasjonsresultater direkte fra flytende buljong enn fra faste medier. Økende alder på kulturen ser ut til å gi dårligere scoreverdi. Produsenten av databasen angir terskelverdi for hva som er godkjent.

Artene i *M. tuberculosis* komplekset er fylogenetisk svært like og lar seg vanskelig differensiere uavhengig av identifikasjonsprosedyre. Det samme gjelder *M. chimaera/intracellulare*, *M. mucogenicum/phocaicum*, *M. marinum*/*M. shotsii*, *M.*

*kansasii/M. gastri*. Subarter av *M. abscessus* kan differensieres, men å differensiere mellom *M. abscessus* ssp. *abscessus* og *M. abscessus* ssp. *massiliense* har vist seg arbeidskrevende.

Identifikasjon av mykobakterier (først og fremst nontuberkuløse mykobakterier) ved hjelp av MALDI-TOF MS kan være aktuelt å innføre på laboratorier som dyrker mykobakterier og har et MALDI-TOF MS system. Hvert laboratorium må vurdere behovet for rask identifikasjon opp mot ressursbruken som kreves.

Valg av identifikasjonsprosedyre bør følge retningslinjer fra produsent av spekterbibliotek. Det bør primært utføres identifikasjon fra faste medier, men på sikt bør det utvikles en universal standardprosedyre for identifikasjon fra flytende medier. Identifikasjon av mykobakterier med MALDI-TOF MS må foreløpig bekreftes med annen etablert metode. Isolatet sendes referanselaboratorium for bekreftende identifikasjon (hvis ikke utført på innsendende laboratorium) og oppbevaring i stammebank. Identifikasjon av mykobakterier utføres i på referanselaboratoriet per i dag med LPA (line probe assay) fra både flytende og fast medium.

### 1.4.3 Molekylære metoder

Identifikasjon av mykobakterie-isolater til arts- eller kompleksnivå er viktig siden de i varierende grad gir sykdom, har ulikt smitte potensiale og behandles forskjellig. Genetisk identifikasjon benyttes nå i stor utstrekning og det er per i dag beskrevet 175 forskjellige arter og 13 subspecies.

Flere målområder er egnet til gen-sekvensanalyse for identifikasjon av mykobakterier. De mest brukte er genene som koder for ribosomalt RNA (16S rDNA), 65-kDa heat shock protein (*hsp65*), RNA polymerase  $\beta$ -subenheten (*rpoB*), 23S rDNA, 16S-23S Internal Transcribed Spacer (ITS), og DNA gyrase B (*gyrB*). Krav til mål-genene er at de må være tilstede i alle mykobakterier og må inneholde både konserverte og variable områder. De konserverte områdene er mål for PCR-primere (broad-range PCR) og de variable må være arts- eller kompleks-spesifikke, men ikke variere innen arten.

#### 1.4.3.1 Genotypisk identifikasjon av artene i *M. tuberculosis*-komplekset (MTBC)

Artene i MTBC er genetisk veldig like. De kan ikke skilles ved analyse av de vanligst brukte mål-genene, men *gyrB* og RD (regions of difference) har vist seg å kunne skille enkelte av artene. Imidlertid kan alle artene i MTBC gi tuberkuløs sykdom og i første omgang er det vesentlig å få bekreftet/avkrefte at isolatet tilhører MTBC.

Genotype MTBC (line probe assay; LPA) fra Hain benytter analyse av flere mål-gen for å identifisere artene i komplekset. Nasjonalt referanselaboratorium (NRL) ved Folkehelseinstituttet (FHI) benytter denne testen på alle mottatte isolat i MTBC for konfirmasjon og identifikasjon. Testen kan ikke skille mellom *M. tuberculosis* og *M. canettii* eller *M. africanum* og *M. pinnipedii*, men NRL rapporterer enten *M. tuberculosis* eller *M. africanum* rutinemessig, hvis ikke kliniske opplysninger eller andre undersøkelser taler for en annen artsidentifikasjon.

### 1.4.3.2 Genotypisk påvisning av *M. leprae*

*M. leprae* lar seg ikke dyrke, men kan påvises med PCR direkte i prøvematerialet. GenoType LepraeDR (LPA) fra Hain kan samtidig påvise *M. leprae* og resistens mot rifampicin, ofloxacin og dapson. Per i dag er denne testen ikke tilgjengelig i Norge.

### 1.4.3.3 Genotypisk identifikasjon av NTM

NTM er vanlig forekommende miljømikrober (finnes i jord og vann), men kan gi sykdom hos mennesker. Identifikasjon til art- eller kompleksnivå kan være vesentlig for vurdering av klinisk betydning og valg av behandling. Analyse av mål-gen med sekvensering, hybridisering, restriksjonsfragment lengde polymorfisme (RFLP), pyrosekvensering, next generation sequencing (NGS) og microarray er alle metoder som er beskrevet for identifikasjon av NTM, men hybridiseringstester med spesifikke DNA-prober er mest brukt og identifiserer de vanligste artene.

#### 1.4.3.3.1 HYBRIDISERINGSTESTER

Det er flere kommersielt tilgjengelige tester med ulike mål-gen, og antall arter som påvises og som kan skilles fra hverandre, varierer. Det er viktig å være klar over at feilidentifikasjon er beskrevet for alle hybridiseringstestene.

Det er to GenoType tester (LPA) fra Hain (Mycobacterium CM og Mycobacterium AS) som begge har 23S rDNA som mål-gen og identifiserer tilsammen omkring 30 ulike arter. NRL benytter disse testen på mottatte NTM-isolat som ikke er endelig identifisert ved innsendende laboratorium.

GenoType NTM-DR (LPA) kan skille artene i *M. avium*-komplekset og de ulike *M. abscessus* subspecies, samtidig kan den påvise resistens for makrolider og aminoglykosider. Testener under validering ved NRL.

INNO-LiPA Mycobacteria v2 bruker 16S-23S Internal Transcribed Spacer (ITS) som mål-gen. I motsetning til Genotype testene kan ikke INNO-LiPA skille mellom *M. abscessus* og *M. chelonae* eller *M. marinum* og *M. ulcerans*.

AccuProbe bruker 16S rDNA som mål-gen. Det er seks kit tilgjengelige, men disse er i mindre bruk nå enn tidligere.

Speed-oligo Mycobacteria bruker 16S rDNA til påvisning av Mycobacterium genus og 16S-23S Internal Transcribed Spacer (ITS) for nærmere differensiering.

#### 1.4.3.3.2 SEKVENSERING

##### 1.4.3.3.2.1 MÅLGEN

Med sekvensering kan i prinsippet alle mykobakteriearter identifiseres i én og samme reaksjon. Områder i 16S rDNA, *hsp65* og *rpoB* har vist seg egnet for identifikasjon av mykobakterier, og en kombinasjon av flere mål-gen er beskrevet å gi en mer presis identifikasjon, spesielt for nye arter. Noen laboratorier i Norge inklusive NRL, benytter sekvensering av ulike målgen rutinemessig for identifikasjon av NTM.



Det er utført helgenom-sekvensering for > 40 mykobakteriearter. Detaljert informasjon om pågående og fullførte prosjekter finnes på <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/>.

#### 1.4.3.3.2 SEKVENSDATABASESØK

Likhet med sekvenser i databasene danner grunnlaget for identifikasjon. GenBank er mest brukt. Der legges alle publiserte sekvenser, og den er fritt tilgjengelig. Fordi sekvenser som legges inn i GenBank kan være dårlig validert, - det er ikke nødvendigvis sekvensen som kommer ut med høyest score som er korrekt og enkelte isolater kan ha blitt feil identifisert, er det viktig å kritisk vurdere svar på søkene. Det er derfor også anbefalt i tillegg å søke i andre databaser som EZTaxon, leBIBI, Ribosomal Database Project (RDP) eller den kommersielle databasen RipSeq (Isentio, CA). Med RipSeq er det også mulig å identifisere flere bakterier i en blandingskultur.

Det er ingen etablert algoritme for besvarelse av sekvenseringsbasert identifikasjon av mykobakterier. Ved analyse av de 500 første basene i 16S rDNA anbefaler imidlertid Clinical and Laboratory Standards Institute at isolater som har 100% likhet med sekvensen til én art ved database-søk besvares med artsnavn, og de med 99 – 99,9% likhet besvares med *Mycobacterium* sp, mest lik [artsnavn].

## 1.5 Resistensbestemmelse av mykobakterier

### 1.5.1 Resistensbestemmelse av *M. tuberculosis*-komplekset (MTBC)

Alle nye MTBC-isolat i Norge undersøkes mtp resistens, og testingen bør repeteres hvis fortsatt vekst etter 3 måneders behandling.

#### 1.5.1.1 Fenotypisk testing av MTBC

Laboratorier som utfører resistensbestemmelse må ha erfarne ingeniører til å utføre den. All testing må foregå i inneslutningsnivå 3. Det må rutinemessig utføres interne kvalitetskontroller og deltagelse i eksterne kvalitetskontroll-programmer er påkrevet. Identifikasjon av isolatet bør gjøres før resistensbestemmelse for å utelukke at det er en "non-tuberculous mycobacteria" (NTM) og identifikasjon av arten innad i MTBC er viktig for å kunne tolke PZA-resultatet, siden *M. bovis* har iboende resistens. Testingen utføres på et medikament som er representativ for en gruppe eller på individuelle medikamenter. Blant førstelinje-medikamentene er PZA-resultatet mindre pålitelig enn for de andre. Generelt er testingen av andrelinje-medikamentene mindre standardisert enn førstelinje-medikamentene.

Alle nye MTBC-isolat i Norge skal testes fenotypisk for førstelinje-medikamentene isoniazid (INH), rifampicin (RMP), ethambutol (ETB), og pyrazinamid (PZA), og kritiske konsentrasjoner i hht anbefalinger fra WHO:

*Implementing tuberculosis diagnostics. Policy Framework. World Health Organization, 2015.*  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162712/1/9789241508612\\_eng.pdf?ua=1&ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162712/1/9789241508612_eng.pdf?ua=1&ua=1)



*Updated interim critical concentrations for first-line and second-line DST (as of May 2012).*  
Geneva, World Health Organization, 2012.

<http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/Updated%20critical%20concentration%20table%201st%20and%202nd%20line%20drugs.pdf>, accessed 5 March 2015

*Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs.*

Geneva, World Health Organization, 2008 (WHO/HTM/TB/2008.392)

[http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO\\_HTM\\_TB\\_2008.392\\_eng.pdf?ua=1](http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_HTM_TB_2008.392_eng.pdf?ua=1)

I dag utføres testingen på det Nasjonale referanselaboratoriet for mykobakterier (NRL) ved FHI og i tillegg på OUS (både Rikshospitalet og Ullevål) for stammene som isoleres der. Alle tre laboratoriene benytter det helautomatiske Becton Dickinson BACTEC MGIT 960 med flytende Middelbrook medium (7H9). Kulturen bør sendes til FHI før resistensresultatene på primærlaboratorium foreligger. Alle isolat med påvist resistens blir undersøkt på nytt ved NRL, med genetiske eller fenotypiske metoder.

Ved påvist MDR-TB, polyresistens (resistens for 2 eller flere førstelinje-medikamenter) eller ved monoresistens mot RMP eller INH, utføres testing ved NRL for andrelinje-medikamentene amikacin (AMK), capreomycin (CAP), prothionamid (PTH), moxifloxacin (MOX) og linezolid (LIN). Kanamycin (KAN) og ofloxacin (OFX) kan testes ved behov og benyttes dessuten ved eksterne kvalitetskontroller. Rifabutin (RBT) kan også være aktuelt ved påviste *rpoB*-mutasjoner som ikke er assosiert med sikker RBT-resistens. Denne utvidede testing gjøres kun ved NRL og foregår også med MGIT 960 systemet med TB eXiST/EpiCenter programvare, og med kritiske konsentrasjoner i hht WHO (for referanse se over).

Alle MDR og RMP-resistente isolat videresendes til Supranasjonalt referanselaboratorium (SNRL) på Folkhälsomyndigheten i Solna (Sverige) for testing av cycloserin (LJ 30 mg/L), PAS (LJ 1 mg/L) og clofazimin (MGIT 960 med primært ved 0.5 mg/L, ved resistens også ved 1 og 2 mg/L). Resistenstesting for delamanid og bedaquilin er under etablering, og sannsynlig vil de kunne tilby dette innen utgangen av 2017. Disse to medikamentene er aktuelle hvis standard-regime for MDR-TB ikke kan benyttes.

#### 1.5.1.2 Genetisk testing av MTBC

Fenotypisk resistenstesting er ansett å være gull-standard for MTBC, men genetisk testing kan gi raskere informasjon om mutasjoner og resistensforhold.

Prøver fra pasienter med høy pre-test sannsynlighet for MDR-TB bør testes for *rpoB*-mutasjon direkte i prøvematerialet og/eller i kultur. Mange laboratorier tester en stor del av sine prøver og ut ifra et smittevern-perspektiv er det gunstig å få en rask avklaring av resistens ved en smitteførende lungetuberkulose (direkte mikroskopi-positive). Ved lav pre-test sannsynlighet for MDR-TB bør påvist *rpoB*-mutasjon direkte i prøvematerialet bekreftes ved retesting av ny prøve, samt bekreftes ved resistensbestemmelse av isolatet. For påvisning direkte i prøvematerialet bør dette kunne gjøres innenfor helseregionen, eventuelt i annen helseregion etter avtale mellom sykehusene/laboratoriene.

Ved uoverensstemmelse mellom fenotypisk og genetisk resistensresultat bør det gjøres sekvensering av *rpoB*-genet, hvis det ikke er påvist en spesifikk mutasjon ved LPA (line probe assay). Ved påvist *rpoB*-mutasjon og ved fravær av villtypebånd uten spesifikt mutasjonsbånd ved LPA, bør sekvensering utføres for å påvise den eksakte mutasjonen.

Mer enn 95% av rifamycinresistente stammer har en mutasjon i 81-bp regionen av *rpoB*-genet. De vanligst mutasjonene S531L og H526Y/D gir høygradig resistens for alle rifamycinene, mens andre mutasjoner kan ha en begrenset effekt på følsomheten for de enkelte medikamentene. RBT kan være effektivt ved enkelte mutasjoner selv om de gir RMP-resistens.

Selv om >90% av RR stammer også er INH resistente, er det viktig å få utført molekylær testing mtp INH-resistens når RMP-resistens er påvist.

Ved påvist *rpoB*-mutasjon direkte i prøvematerialet eller når fenotypisk testing indikerer RR eller MDR-TB, bør man utføre molekylær testing for påvisning av resistens mot andrelinje-medikamenter (second line injectable drugs; SLID) for å kunne gi behandlingsråd og redusere tiden for påvisning av XDR TB.

Dagens praksis for påvisning av resistensmutasjoner med LPA ved NRL bør videreføres:

Alle mottatte kulturer med mistanke om MDR, RMP- eller INH-resistent TB, testes med GenoType MTBDR*plus* for påvisning av mutasjoner i *rpoB*, *katG* og *inhA* genene, for å kunne si noe foreløpig om RMP- og INH-følsomhet.

Testen utføres også etter ønske fra behandlende lege og ved påvist smitteførende lungetuberkulose hvis ikke resistensresultat allerede foreligger.

Bruk av GenoType MTBDR*plus* direkte på prøvematerialet fra direkte mikroskopi-positive respiratorisk prøver er under validering. Prøven må være ferdig Nalc-NaOH-behandlet før innsending og det anbefales at den også dyrkes ved primærlaboratoriet.

For å kunne si noe foreløpig om følsomhet for fluorokinoloner og andrelinje injiserbare medikamenter, blir alle mottatte kulturer hvor MDR eller RMP-resistent TB er påvist testet med GenoType MTBDR*s/v2* for påvisning av mutasjoner *gyrA*, *gyrB*, *rrs* og *eis* genene.

Helgenomsekvensering er under etablering ved NRL og vil sannsynlig i fremtiden være metoden som benyttes for påvisning av mutasjoner som er assosiert med resistens.

Ved bruk av molekylære metoder som påviser en spesifikk mutasjon, bør svarrapporten inneholde informasjon om hvilken mutasjon som er påvist og hvilken betydning dette har for valg av medikamenter i behandlingsregime.

Ved fravær av mutasjoner bør det fremgå av svarrapporten at dette ikke utelukker resistens for det aktuelle medikamentet, men for RMP kan man ved fravær av *rpoB* mutasjon si med stor grad av sikkerhet at stammen er følsom for rifampicin.

### 1.5.2 Resistensbestemmelse av NTM (non-tuberculouse mycobacteria)

Det kan være aktuelt å resistensteste klinisk relevante NTM-isolat, både hurtigvoksende mykobakterier (rapid growing mycobacteria, RGM) og enkelte langtsomvoksende mykobakterier. Resistenstesting kan utføres for begge grupper med buljong mikrofortynningsmetoden i hht metode fra CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Denne standarden gir retningslinjer for RGM, *M. avium*-komplekset (MAC), *M. kansasii* og *M. marinum* i hht retningslinjer fra American Thoracic Society (ATS) og Infectious Diseases Society of America (IDSA (Griffith DE et al. 2007)). For andre mykobakterier foreligger det ikke tilstrekkelig data til å kunne si noe om klinisk effekt ut ifra *in vitro* resultat.

RGM testes og rapporteres med MIC og SIR-kategori for en rekke antibiotika, noe avhengig av arten som testes. Etter 3-5 dagers inkubering kan resultatene avleses, med unntak av induserbar makrolidresistens som ikke kan utelukkes før etter 14 dagers inkubering.

Blant de langsomtvoksende mykobakterier er det først og fremst aktuelt å teste MAC for makrolider, eventuelt for linezolid og moxifloxacin (ved makrolid-resistens eller medikament-allergi). Resultatene rapporteres med MIC og SIR-kategori, men sikker sammenheng mellom *in vitro* resultat og klinisk respons har kun blitt vist for makrolider. Generelt er villtype-isolat følsomme for makrolider.

Rutinemessig resistenstesting av ubehandlede *M. kansasii*-isolat er ikke nødvendig, men ved terapivikt anbefales det å teste primært for RMP og clarithromycin. Ved resistens mot RMP er det aktuelt å teste flere antibiotika. Resultatene rapporteres med MIC og SIR-kategori (der det etablert brytningspunkt).

Rutinemessig resistenstesting av *M. marinum* er ikke anbefalt, men kan vurderes når det fortsatt er vekst etter flere måneders behandling. En rekke antibiotika er aktuelle og resultatene rapporteres med MIC verdi og SIR-kategori.

Resistensbestemmelse av RGM utføres i dag ved NRL i henhold til CLSI-standard, mens de langsomtvoksende mykobakteriene videresendes per i dag til Karolinska Universitetslaboratoriet i Solna, Sverige som benytter tilsvarende metodikk og standard. Forhåpentlig kan testing også av langtsomtvoksende NTM bli etablert ved NRL innen rimelig tid.

Genetisk testing for påvisning av makrolid- og aminoglykosid-resistens kan være aktuelt for enkelte arter. Det foreligger nå en LPA fra Hain, NTM-DR, som påviser mutasjoner i *rrl* og *rrs*, og dessuten tilstedeværelse av *erm* (41) genot og mutasjoner her. Testen er under validering ved NRL.

## 1.6 Molekylærepidemiologisk undersøkelse av *M. tuberculosis*

Molekylærepidemiologiske metoder er verktøy for å sannsynliggjøre eller avkrefte transmisjonslinker mellom pasienter med tuberkulose (TB). Det er også nyttig for å avdekke krysskontaminasjon i laboratoriet og dessuten for å kunne skille reinfeksjon fra reaktivering.

Fra rundt 1990 og frem til ca 2005 ble *IS6110* RFLP (restriction fragment length polymorphism)-typing og spoligotyping benyttet som molekylærepidemiologiske metoder.

Fra ca 2005 har MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number Tandem Repeats) gradvis tatt over som standard molekylærepidemiologisk metode og den har blitt benyttet på Nasjonalt referanselaboratorium for mykobakterier (NRL) ved Folkehelseinstituttet (FHI) fra 2010. Denne metoden er hurtig, standardiserbar og dessuten er resultatene enkle å dele samt lagre i databaser. Databasen MIRU-VNTRplus er et nyttig verktøy for å sammenligne egne stammer med stammer som er meldt inninternasjonalt. MIRU-resultater rapporteres til det europeiske overvåknings-systemet TESSy (The European Surveillance System) og i januar 2016 ble det utgitt en «Surveillance report for Molecular typing for surveillance of multidrug-resistant tuberculosis in the EU/EEA» fra ECDC <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/multidrug-resistant-tuberculosis-molecular-typing-surveillance.pdf>.

Selv om dette er et svært nyttig verktøy, er identiske MIRU-mønstre på ingen måte en garanti for at en direkte kobling eksisterer mellom to pasienter, eller at disse er del av en pågående smitteskjed. Ved FHI kombinerer man epidemiologiske data fra smittesporing med molekylære data for å kartlegge mulige og potensielle smitte-episoder og utbrudd.

Fra 2016 har FHI også begynt å ta i bruk «short read sequencing» / neste generasjons DNA sekvensering (NGS) som en komplimentær metode. Denne sekvenseringen utføres nå ved FHI ved bruk av Illumina MiSeq. Implementering av metoden og bruk av resultatene er under etablering ved NRL. Med NGS kan man med mye større sikkerhet identifisere aktive smitteskjeder, men man kan fortsatt ikke enkelt svare på spørsmål som "hvem smittet hvem". Metoden er også svært effektiv for deteksjon av resistensmutasjoner. Det jobbes for tiden internasjonalt med validering og standardisering for bruk av NGS både for epidemiologisk overvåkning og påvisning av resistensmutasjoner.

## 1.7 IGRA – interferon gamma release assays

Tilgjengelige IGRA for tuberkulose er Quantiferon TB Gold In tube (QFT) og T-spot TB. I praksis utføres det få tester med T-spot TB i Norge, gjennomgangen legger derfor hovedvekt på QFT.

QFT anbefales for diagnostikk av latent tuberkulose, og testen bør benyttes hovedsakelig der et positivt testresultat vil medføre at pasienten tilbys behandling. QFT er også et nyttig verktøy ved smitteoppsporing og testen bør da tas 8-10 uker etter siste smitteeksponisjon. IGRA anbefales ikke ved diagnostikk av aktiv TB. Testen har god negativ prediktiv verdi hos

immunfriske voksne, men data for barn og immunsvekkede er stadig usikre. Det er ikke holdepunkter for at IGRA kan predikere utvikling til aktiv TB hos den enkelte pasient.

Det er betydelig variabilitet i testresultater for IGRA, og årsakene kan være preanalytiske, analytiske, biologiske, eller skyldes variasjon i kit/lot. Det er ofte en kombinasjon av en rekke faktorer, men de enkeltfaktorene som ser ut til å påvirke resultatet mest er variabilitet i tid før inkubering og variasjon i blodvolum som benyttes. Variabilitet har størst praktisk betydning for resultater omkring cutoff og medfører behov for at gråsoneverdier etableres. Fremgangsmåte for dette ble diskutert på møtet. Gråsone kan utarbeides basert på variasjon på eget laboratorium, for eksempel etter følgende formel: cutoff +/- 2xCV%. På grunn av høy grad av variabilitet og betydelige kliniske konsekvenser av svaret, bør det også innføres et område for svakt positive prøver (for eksempel området fra øvre del av gråsone til 2 x cutoff). For både gråsoner, svakt positive resultater og inkonklusive resultater anbefales det at prøven reanalyseres, samt at det tas kontrollprøve etter 3-6 uker. Der resultatet blir inkonklusivt av tekniske årsaker kan kontrollprøve tas umiddelbart.

Det bør rapporteres både en kvalitativ og kvantitativ tolkning, gjerne også en tallverdi (verdi av TBag fratrukket Nil, se 1.7.1). Verdien oppgis i IU/mL. Laboratoriets kommentarer bør ta høyde for usikkerheten i tolkningen av resultatene, og understreke at resultatene alltid må sees i sammenheng med klinikk, resultat av annen diagnostikk og pasientens totale risiko. Det kan også være hensiktsmessig å kommentere negative resultater der mitogenresponsen er dårlig selv om verdien gir gyldig testresultat. Mitogenverdier < 3 IU/mL er vist å medføre økt usikkerhet i svaret.

En ny versjon av QFT er på vei, og det anbefales at laboratoriene forbereder overgang fra QFT Gold til QFT Gold Plus. Møtet ønsket at anbefaling for svarrapportering av den nye versjonen ble utformet. Dette har blitt gjort og anbefalingen er inkludert her.

T-spot TB anbefales som oppfølgingsmetode når det foreligger et inkonklusivt QFT-resultat. Analysen kan også være aktuell ved negativt QFT-resultat hos pasient med betydelig immunsvekkelse.

### 1.7.1 Svarrapportering ved overgang til ny versjon av Quantiferontest

I forbindelse med overgangen til ny versjon av Quantiferontest (fra QFT Gold til QFT Gold Plus) er det stilt spørsmål fra flere laboratorier om hvordan svaret bør oppgis til rekvisit. Det er ønskelig at laboratoriene i Norge har en felles måte å rapportere svaret på. Denne anbefalingen er utformet av Heidi Syre i samråd med programkomiteen for årets strategimøte og Anne-Marte Bakken Kran. Den har vært på høring på MikInfo og tilbakemeldinger er inkludert i denne anbefalingen.

Den nye versjonen har 4 testrør; Nil (grå kork), TB Antigen 1 (grønn kork), TB Antigen 2 (gul kork) og Mitogen (lilla kork). Det er to rør med TB-spesifikke antigener og testen gir ut to svarverdier (TBAg1 – Nil og TBAg2 – Nil). I de to testrørene måles ulike cellulære immunresponser. I TBAg1 måles CD4-respons og i TBAg2 måles CD4- og CD8-respons. Tabell 1 viser produsentens anbefaling for tolkning av Quantiferon-testen.

Nil	TBAg1 – Nil	TBAg2 – Nil	Mitogen – Nil	Tolkning
≤ 8.0	< 0.35	< 0.35	≥ 0.5	Negativ
≤ 8.0	≥ 0.35 og < 25% av Nil	≥ 0.35 og < 25% av Nil	≥ 0.5	Negativ
≤ 8.0	Alle verdier	≥ 0.35 og ≥ 25% av Nil	Alle verdier	Positiv
≤ 8.0	≥ 0.35 og ≥ 25% av Nil	Alle verdier	Alle verdier	Positiv
≤ 8.0	< 0.35	< 0.35	< 0.5	Inkonklusiv
≤ 8.0	≥ 0.35 og < 25% av Nil	≥ 0.35 og < 25% av Nil	< 0.5	Inkonklusiv
> 8.0	Alle verdier	Alle verdier	Alle verdier	Inkonklusiv

Tabell 1. Produsentens anbefaling for tolkning av Quantiferontesten.

På strategimøtet for bakteriologi høsten 2016 ble Quantiferontesten diskutert. Konklusjonen fra møtet ble følgende:

- Det bør rapporteres både kvalitativ og kvantitativ tolkning, gjerne også en tallverdi
- Det bør utarbeides grenseverdier/gråsoner basert på variasjon ved eget laboratorium (for eksempel cutoff ± 2 x CV%)
- Det bør innføres et område for svakt positive testresultat (for eksempel fra øvre grense for gråsoner til 2 x cutoff)
- Kommentarer bør ta høyde for usikkerhet i tolkningen av resultatene, og understreke at resultatene alltid må sees i sammenheng med klinikk, resultat av annen diagnostikk samt pasientens totale risiko for TB-infeksjon
- Det er hensiktsmessig å kommentere negative svar der mitogenresponsen er lav (for eksempel < 3 IU/mL) selv om verdien gir gyldig testresultat

For den nye versjonen av Quantiferontesten foreslås det å følge konklusjonene fra Strategimøtet for bakteriologi 2016. Det er nok at en av tallverdiene er positiv for at testen er positiv. Det bør etableres intervaller for grenseverdi/gråsoner og svakt positive testresultater for begge testrørene.

#### 1.7.1.1 Forslag til svarrapportering og analysekommentarer

Det bør rapporteres en kvalitativ og kvantitativ tolkning, gjerne også en tallverdi, for hvert av de to antigenrørene eller for røret med høyest verdi. I tillegg bør man gi en konklusjon og en samlet vurdering av resultatet. Dette kan for eksempel gjøres ved at man lager tre analysekoder, en for hvert antigenrør, og en kode for en samlet vurdering av resultatet med kommentar:

P-IFN $\gamma$  (TBAg1) ... IU/mL

P-IFN $\gamma$  (TBAg2) ... IU/mL

**Analyseresultat:** Positiv, Svak positiv, Negativ, Grenseverdi/Gråsoner eller Inkonklusiv

**Analysekommentar:** Prøven er undersøkt for reaktivitet mot *M. tuberculosis*-komplekset ved interferon-gamma-undersøkelse (QuantiferonTB Gold Plus) med

- negativt resultat i begge antigenrør
- positivt resultat i begge antigenrør
- grenseverdi omkring cutoff for testen i begge antigenrør
- positivt resultat i det ene antigenrøret og negativt resultat/grenseverdi omkring cutoff for testen i det andre antigenrøret
- svak positiv reaksjon like over cutoff for testen i det ene antigenrøret og negativt resultat/grenseverdi omkring cutoff i det andre antigenrøret
- ...el.l...

**Kommentar til alle svar:**

Resultatet må sees i sammenheng med smitterisiko, immunstatus og resultat av annen diagnostikk.

**Tilleggskommentarer ved positivt resultat:**

Analysen skiller ikke mellom latent infeksjon og aktiv sykdom. Ved mistanke om aktiv tuberkuløs sykdom anbefales innsending av egnet prøvemateriale til direkte agenspåvisning.

**Tilleggskommentarer ved svakt positivt resultat:**

Resultatet ligger like over cutoff for analysen. Analysen skiller ikke mellom latent infeksjon og aktiv sykdom. Ved mistanke om aktiv tuberkuløs sykdom anbefales innsending av egnet prøvemateriale til direkte agenspåvisning.

**Tilleggskommentarer ved grenseverdi/gråsoner:**

Metodens sensitivitet har vist seg variabel, særlig for enkelte pasientgrupper (f.eks. små barn og pasienter med immunsvikt).

Ved reell mistanke om aktiv tuberkuløs sykdom anbefales innsending av egnet prøvemateriale til direkte agenspåvisning.

**Tilleggskommentarer ved negativt resultat:**

Metodens sensitivitet har vist seg variabel, særlig for enkelte pasientgrupper (f.eks. små barn og pasienter med immunsvikt).

For å konkludere med negativt resultat etter kjent smitteeksponering må det ha gått minst 8-10 uker.

Eventuelt ytterligere tilleggskommentar ved negativt resultat og lav mitogenverdi, se under.

**Tilleggskommentar ved negativt resultat og lav mitogenverdi:**

Resultatet må tolkes med forsiktighet fordi nivå av IFN $\gamma$  i positiv kontroll er lav, noe man ofte kan se hos immunsupprimerte pasienter. Dette kan medføre økt usikkerhet i analyseresultatet. Ved reell mistanke om latent tuberkulose anbefales ny prøve. Alternativt kan T-SPOT.TB ved Folkehelseinstituttet vurderes.

*Det finnes foreløpig ikke litteratur som støtter denne tilleggskommentaren, men arbeidsgruppen synes det er hensiktsmessig å informere rekvirent ved lavmitogenrespons.*

**Kommentar ved inkonklusivt resultat pga lav mitogenverdi:**

Prøven lar seg ikke vurdere for respons mot antigen fra *M. tuberculosis*-komplekset med denne analysen pga. lav verdi i positiv kontroll.

Dette kan skyldes at pasienten er immunsvekket eller har et umodent immunforsvar, eller være relatert til preanalytiske forhold. Ny prøve anbefales (*NB kun første gang*).

Alternativt kan T-SPOT.TB ved Folkehelseinstituttet vurderes.

**Kommentar ved inkonklusivt resultat pga høy verdi i nil:**

Prøven lar seg ikke vurdere for respons mot antigen fra *M. tuberculosis*-komplekset med denne analysen pga. høy verdi i negativ kontroll. Dette kan være relatert til en aktuell infeksjons- eller inflammasjonstilstand, eller preanalytiske forhold.

Kontrollprøve anbefales (*NB kun første gang*).

**1.7.1.2 Forslag til algoritmer for retesting og kontrollprøver**

Ved grenseverdi/gråsoneresultat bør prøven reanalyseres og kontrollprøve anbefales etter 3-6 uker.

Ved svakt positivt resultat bør kontrollprøve anbefales etter 3-6 uker.

Ved inkonklusivt resultat bør kontrollprøve anbefales.

Ved negativt resultat hos nylig smitteeksponerte bør ny prøve anbefales 8-10 uker etter siste smitteeksponering.

T-SPOT.TB ved Folkehelseinstituttet bør vurderes ved immunsuppresjon.



## 2 BAKGRUNNSINFORMASJON

### 2.1 Prøvetaking og forsendelse

Mogens Jensenius, infeksjonsmedisinsk avdeling, Ullevål, Oslo universitetssykehus  
[mogens.jensenius@medisin.uio.no](mailto:mogens.jensenius@medisin.uio.no)

Ved mistanke om infeksjon forårsaket av mykobakterier er isolering og identifisering av den aktuelle mykobakteriearten svært viktig. Et absolutt krav er at prøver til mykobakteriediagnostikk tas før oppstart av en eventuell empirisk behandling, slik at denne senere kan modifieres basert på identifikasjon og resistensundersøkelse.

Viktige faktorer for å sikre positive dyrking er optimal prøvetaking, stort nok prøvevolum, samt korrekt transport.

Prøvetaking vil avhenge av antatt infeksjonsfokus. Kontaminasjon må unngås, og med unntak av blodkulturer og beinmargaspirat må alle prøver legges i sterile beholdere uten tilsetning (evt tilsatt litt fysiologisk saltvann ved fare for inntørring). Se tabellene for detaljert informasjon.

Prøveglass må merkes med pasient-id, prøvetype, samt dato og klokkeslett for prøvetaking. Ved søl på prøveglasset (særlig aktuelt ved luftveisprøver) må prøveglass tørkes på utsiden med godkjent desinfeksjonsmiddel før transport. Det er viktig med kliniske opplysninger på rekvisisjonen. Prøvene må sendes raskest mulig til laboratoriet, og må ikke utsettes for dagslys eller UV-stråling. Hvis prøven ikke kan sendes i løpet av en times tid, bør den settes i kjøleskap. Unntaket er blodkultur og beinmargaspirat som må oppbevares i romtempertur. Tid fra prøvetaking til undersøkelse i laboratoriet bør ikke overgå 7 døgn.

Ikke sterile prøvematerialer	Prøvetaking	Kommentar
Ekspektorat	Helst fastende morgenprøve. Skyll munnen før prosedyren. Trekk flere dype pust og host direkte i prøveglasset. Evt kan pasienten hvile på forhånd med syk side opp. Evt kan fysioterapeut assistere. Minst 3 ml i steril beholder uten tilsetning.	Sensitivitet ved 1 prøve er ca. 85%, ved 2 prøver ca. 94% og ved 3 prøver ca. 97%. Ta helst 3 prøver på 3 ulike dager
Indusert sputum	Helst fastende morgenprøve. Inhalasjon av hypertont (3%) saltvann via forstøverapparat. Pasient må kunne samarbeide. Minst 3 ml i steril beholder uten tilsetning. Personale må bruke åndedrettsvern. Prosedyren bør skje i rom med undertrykksventilasjon, og helst med mulighet for UVC-bestråling etter prosedyren	Gir bedre prøvemateriale fra dype luftveier enn ekspektorat. Også egnet for kontroll av behandlingen. Ta helst 3 prøver på 3 ulike dager.
Bronkialsyllevæske (BAL)	Instillasjon av 10-50 fysiologisk fulgt av aspirasjon via bronkoskop	Aktuelt hvis pasienten ikke kan produsere ekspektorat eller ta indusert sputum, eller hvis slike prøver er negative til tross for begrunnet mistanke om infeksjon.
Ventrikkelaspirat	Fastende morgenprøve. Nasogastrisk eller orogastrisk sonde. La pasienten drikke (alt. installér i sonden) 100-300 ml sterilt vann (ikke fysiologisk saltvann), og aspirer deretter med 50 ml sprøyte. Overfør aspiratet til steril beholder uten tilsetning. Tilsett natriumbikarbonat-løsning (0,5 mmol/ml) til pH ca 7 (sjekkes med urinstix).	Ved mistanke om pulmonal infeksjon hos pasient som ikke kan ta sputumprøve (f eks yngre barn, og eldre, skrøpelige pasienter som ikke samarbeider og/eller ikke tåler indusert sputum eller bronkoskopi). Ta helst 3 prøver på 3 ulike dager
Urin	Morgenurin, midtstrømsprøve, 50-100 ml i steril beholder uten tilsetning	Ved mistanke om urogenital eller miliær infeksjon. Ta helst 3 prøver på 3 ulike dager
Avføring	Minst 1 gram i steril beholder uten tilsetning	Ved mistanke om intestinal infeksjon. Vevsbiopsier (fra f eks tarmtumor) gir høyere sensitivitet enn dyrking av avføring. Ta helst 3 prøver fra 3 ulike avføringer.
Overfladisk puss og sekret	Ta så mye materiale som mulig, i steril beholder uten tilsetning (evt penselprøve i Amies transportmedium hvis annet ikke er mulig)	

<b>Sterile prøvematerialer</b>	<b>Prøvetaking</b>	<b>Kommentar</b>
Spinalvæske	Minst 2 ml, helst 5 ml (voksne). Steril beholder uten tilsetning	
Pleuravæske, ascites, leddvæske, perikardvæske	Ta så stort volum som mulig. Steril beholder uten tilsetning	Biopsier (fra pleura, peritoneum etc) gir høyere sensitivitet enn dyrking fra kroppsvæsker
Vevsprøver/biopsi	Bruk aseptisk teknikk. Steril beholder med litt fysiologisk saltvann for å forhindre inntørking	
Puss fra dyp abscess	Steril beholder uten tilsetning; evt kan man sende aspirert abscessinnhold i plombert sprøyte med godt sikret stempel	

<b>Blodmaterialer</b>	<b>Prøvetaking</b>	<b>Kommentar</b>
Veneblod	3-10 ml blod overføres til BACTEC MYCO F lytic (rød kork)	Ved mistanke om systemisk infeksjon, f eks miliær TB eller disseminert MAC-infeksjon hos immunosupprimerte
Beinmargaspirat	Minst 3 ml aspirat overføres fra sprøyte til BACTEC MYCO F lytic (rød kork)	

## Referenser

Tuberkulose og andre mykobakterieinfeksjoner. Laboratiebøker, Mikrobiologi, Ullevål. OUS 2012, revidert 2014.

Tuberkulos. Vägledning för sjukvårdspersonal. Socialstyrelsen, Sverige, 2009

European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union, Stockholm: ECDC; 2016

Mase SR, Ramsay A, Ng V et al. Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of tuberculosis: a systematic review. Int J Tuberc Lung Dis 2007; 11:485-95.

Mixides G, Shende V, Teeter LD et al. Number of negative acid-smears needed to adequately assess infectivity of patients with pulmonary tuberculosis. Chest 2005; 128:108-115

## 2.2 Vurdering av ekspektoratprøver før diagnostikk av mykobakterier

Heidi Syre, Avdeling for medisinsk mikrobiologi, Stavanger universitetssykehus

### Har kvaliteten på prøver fra nedre luftveier betydning for andel prøver med påvist mykobakterier ved mikroskopisk undersøkelse, nukleinsyre amplifikasjonstest og dyrkning?

#### Forslag til anbefalinger:

*Det anbefales at ekspektoratprøver vurderes makroskopisk av laboratorieansatte med tanke på kvalitet og prøve kvaliteten rapporteres på svarbrevet. Ved dårlig prøve kvalitet bør det oppfordres til ny prøve dersom det er mistanke om aktiv lunge-tuberkulose. Ingen prøver bør avvises.*

*Rekvirent bør vurdere prøve kvaliteten makroskopisk umiddelbart etter prøvetaking og eventuelt ta ny prøve ved dårlig kvalitet. Purulente prøver er av god kvalitet, mens prøver med vandig utseende er av dårlig kvalitet. Det anbefales ikke at kvaliteten av ekspektoratprøver vurderes mikroskopisk før diagnostikk av mykobakterier.*

#### **Makroskopisk vurdering av prøvematerialet**

I følge WHO bør kvaliteten på ekspektoratprøver undersøkes før analyse (1). Purulente prøver, eventuelt tilblandet med litt blod, foretrekkes. Prøver som er tyntflytende eller har vandig utseende er dårlig egnet for mykobakteriediagnostikk (1-3). Klinisk personell bør trenes i undersøkelse av prøve kvalitet slik at det unngås å sende prøver av dårlig kvalitet til laboratoriet. I følge WHO og ECDC bør prøve kvaliteten vurderes makroskopisk på laboratoriet og rapporteres i svarbrev til rekvirent (1, 2). Ved dårlig prøve kvalitet bør kliniker så snart som mulig oppfordres til å ta ny prøve. Det er i midlertid vist at *Mycobacterium tuberculosis* komplekset (MTBC) kan påvises i spyttprøver (4, 5), derfor bør ingen prøver avvises. Blodtilblandet prøve aksepteres, men rent blod bør avvises (2).

Ved litteraturgjennomgang ble det funnet 3 studier som har sett på sammenhengen mellom makroskopisk utseende av ekspektoratprøver og andel positive prøver ved diagnostikk av mykobakterier (4-6). Syrefaste staver ble hyppigere påvist i purulent eller blodtilblandet prøvemateriale enn i spytt og mukoide prøver. Ved makroskopisk vurdering av prøve kvalitet ble færre prøver med syrefaste staver avvist enn ved mikroskopisk kvalitetsvurdering (henholdsvis 0.3% og 3-56%, avhengig av metode brukt for å vurdere representativitet ved mikroskopisk undersøkelse) [6]. Det ble ikke funnet studier som har sett på makroskopisk utseende av ekspektoratprøver og resultat i nukleinsyre amplifikasjonstester (NAATs).

#### **Mikroskopisk vurdering av prøvematerialet**

Syv publikasjoner (6-12) har sammenlignet mikroskopisk kvalitetsvurdering med andel prøver med påvist syrefaste staver eller påvist mykobakterier ved dyrkning. Studiene brukte de samme kvantitative mål for antall leukocytter og plateepitelceller som brukes ved vurdering av prøve kvalitet ved bakteriell pneumoni. Andel prøver som ble vurdert som ikke-representative men som inneholdt syrefaste staver eller hvor det ble påvist mykobakterier ved dyrkning varierte stort i de ulike studiene (0.7-56%). Høyt antall leukocytter var et bedre kriterium for god prøve kvalitet enn lavt antall plateepitelceller eller ratio leukocytter/

plateepitelceller, antakelig fordi ekspektoratprøven kan bli tilblandet med spytt under prøvetakningen, men likevel inneholde mykobakterier.

Det ble kun funnet én studie som har sett på hvordan kvaliteten av ekspektoratprøver påvirker NAATs ved påvisning av MTBC (13). I studien ble 72 ekspektoratprøver fra pasienter med kjent tuberkulose (TB) og 12 prøver fra pasienter uten mistenkt TB undersøkt med PCR (16S rRNA). Resultatet ble sammenlignet med mikroskopisk undersøkelse og dyrkning. Prøver med god kvalitet (>40% celler og <25% epitelceller) hadde en sensitivitet på 72.4% (21 av 29 prøver). Tilsvarende tall for prøver med dårlig kvalitet var 44.2% (19 av 43 prøver). Studien har få inkluderte prøver og det kreves mer kunnskap før det kan trekkes en konklusjon.

#### **Vurdering av ekspektoratprøver fra immunsvekkede**

Sannsynligheten for purulente prøver kan tenkes å være lavere hos immunsvekkede enn hos immunfriske siden immunsvekkede pasienter kan ha redusert evne til pussdannelse. Ved litteraturgjennomgang ble det kun funnet én studie hvor kvalitetsvurdering av prøver fra immunsupprimerte personer ble utført (11). Det ble ikke oppgitt hvor sterkt immunsupprimerte pasientene var. Studien viste at blant prøver av dårlig kvalitet vurdert mikroskopisk vokste det mykobakterier i 1 av 52 prøver (2%), mens tilsvarende tall for prøver av god kvalitet var 25 av 59 (42%). Studien har få inkluderte prøver og det kreves mer kunnskap før det kan trekkes en konklusjon.

#### **Vurdering av ekspektoratprøver fra personer uten aktiv lunge-TB**

For pasienter uten symptomer på aktiv lunge-TB kan det være vanskelig å få avgitt purulente ekspektoratprøver som makroskopisk blir vurdert som god kvalitet. Repetert prøvetakning vil sannsynligvis ikke bedre prøve kvaliteten. Det anbefales derfor at svarbrevet kun oppfordrer til ny prøve dersom det er mistanke om aktiv lunge-TB.

#### **Referanser:**

1. Van Daun A, et al. Laboratory diagnosis of tuberculosis by sputum microscopy. The handbook. Global edition. World Health Organization 2013.
2. EDCD technical document. Handbook on TB laboratory diagnostic methods in the European Union. European Centre for Disease prevention and Control 2016. Doi 10.2900/216384.
3. Pfyffer GE, et al. Mycobacterium: General characteristics laboratory detection and staining procedures. Side 472-502. In: Versalovic J, et al (Editors). Manual of Clinical Microbiology. 10th edition. ASM Press. 2011.
4. Yoon SH, et al. Impact of sputum gross appearance and volume on smear positivity of pulmonary tuberculosis: a prospective cohort study. BMC Infectious Diseases 2012;12:172.
5. Bhat J, et al. Impact of sputum quantity on smear and culture positivity: findings from a tuberculosis prevalence study in central India. Trans R Soc Trop Med Hyg 2013. Doi:10.1093/trstmh/trt100.
6. Khan MS, et al. Judging respiratory specimen acceptability for AFB microscopy: visual vs. microscopic screening. Tropical Medicine and International Health 2009;14:571-5.
7. Lee YL, et al. Acceptability of sputum specimens for diagnosing pulmonary tuberculosis. J Korean Med Sci 2015;30:733-6.

8. Curione CJ, et al. Gram stain evaluation of the quality of sputum specimens for mycobacterial culture. *J Clin Microbiol* 1977;5:381-2.
9. McCarter YS, et al. Quality evaluation of sputum specimens for mycobacterial culture. *Clin Microbiol Inf Dis* 1996;105:769-73.
10. Isaac-Renton JL, et al. Microscopic evaluation of sputum specimens submitted for *Mycobacterium tuberculosis* culture. *Am J Clin Pathol* 1985;84:361-63.
11. Pohl AD, et al. Screening respiratory specimens for mycobacteria culture. *LabMed*. 1993;24:25-7.
12. Havlik D, et al. Screening sputum specimens for mycobacteria culture. *LabMed*. 1995;26:411-3.
13. Da Silva RM, et al. Quality of sputum in the performance of polymerase chain reaction for diagnosis of pulmonary tuberculosis. Brief communication. *Braz J Infect Dis* 2010;14:116-20.

## 2.3 Påvisning av mykobakterier ved direkte mikroskopi

Astri Lervik Larsen, overlege fagområde mikrobiologi, Sykehuset Østfold

### Anbefalt metode

To metoder er tilgjengelige; undersøkelse av Ziehl-Neelsen(ZN)-farget preparat med lysmikroskop, og fluorescensmikroskopi av auramin-farget preparat (IF). Mikroskopi av ZN-preparat er enklere å lære, og mykobakteriene er lettere å kjenne igjen med denne metoden. IF regnes imidlertid som ca 10 % mer sensitiv enn ZN-metoden, i tillegg til at metoden regnes som mindre arbeidskrevende enn lysmikroskopi. Tidligere har det blitt stilt spørsmål tegn ved fluorescensmikroskopis spesifisitet, men en omfattende review-artikkel fra 2006 konkluderer med lik spesifisitet for de to metodene. Det ble ikke funnet forskjell på farging med auramin og auramin-rhodamin. WHO anbefaler fra 2011 at LED basert fluorescensmikroskopi erstatter ordinær fluorescensmikroskopi, og at det fases inn som et alternativ til ZN-mikroskopi. Dersom usikkert resultat av auramin-farget preparat bør kontroll med ZN vurderes. (1-3)

Hurtigvoksende mykobakterier kan være vanskelige å farge. De kan noen ganger avfarges for mye med ZN, og ikke farge i det hele tatt med fluorokromfarging. (4)

### **Forslag til konklusjon:**

Strategimøtet anbefaler at laboratorier som baserer seg på mikroskopi som primærdiagnostikk, benytter fluorescensmikroskopi av auramin-farget preparat. ZN-metode er fortsatt et godt alternativ. Auramin-metoden kan være vanskelig å lære seg, og laboratorier som skal gå over fra ZN-metode til auramin må gjøre en grundig validering før endringen innføres.

For laboratorier som primært benytter genteknologiske metoder spiller det mindre rolle hvilken fargemetode som velges. Ved spesiell mistanke om hurtigvoksende mykobakterier bør det benyttes ZN-farging, vurder svakere avfarging dersom negativt preparat.

### Bruk av kvalitetskontroll

Kvalitetskontroll bør benyttes av alle laboratorier for å kontrollere egne fargemetoder. Etter tillaging av fargereagenser bør disse kontrolleres. ECDC anbefaler for eksempel at man farger og mikroskoperer to utstryk med lav bakterietetthet (1+) og til sammen seks negative utstryk. (5) I denne rapporten anbefales også positiv og negativ kontroll ved hver fargeprosess. Dette samsvarer godt med anbefalingene i Clinical Microbiology Procedures Handbook (6)

### **Forslag til konklusjon:**

Strategimøtet anbefaler at man som et minimum benytter kvalitetskontroll når ny batch av fargereagens tas i bruk. Man kan ta vare på ekstra utstryk av svakt positive og negative prøver, evt benytte ATCC-stammer. Resultatene bør loggføres. Alle laboratorier som utfører mikroskopi bør dessuten delta i eksternt kvalitetssikringsprogram.

### Direkte mikroskopi før eller etter forbehandling?

Clinical Microbiology Procedures Handbook (6) og Manual of Clinical Microbiology (7) anbefaler at prøvematerialer som skal forbehandles mikroskoperes etter forbehandling (og sentrifugering), og at flytende prøvematerialer som ikke skal forbehandles sentrifugeres før

mikroskopi. I en WHO rapport fra 2014 (8) står det at det ikke er dokumentert at konsentrert materiale gir bedre resultat enn ubehandlet, og det anbefales derfor ikke. Kanadiske retningslinjer (9) anbefaler det motsatt av WHO. I disse retningslinjene står det at deteksjonsgrensen for ukonsentrert prøve er 10 ganger høyere enn ukonsentrert, men referanser er ikke oppgitt. CDC (10) anbefaler konsentrert prøve. ECDC har ingen anbefalinger om dette. Publiserte studier om emnet kan tyde på at sensitiviteten øker noe ved mikroskopi etter forbehandling.

**Forslag til konklusjon:**

Strategimøtet anbefaler at mikroskopi utføres på forbehandlet materiale.

Skal cytospin benyttes?

Fire artikler om dette temaet er funnet ved søk i PubMed (11-14).

Artiklene som er publisert på dette er vanskelige å sammenligne fordi ulik metodologi benyttes. I alle fire artiklene finnes lik eller bedre sensitivitet enn den metoden man sammenligner med. Cytosentrifugering/cytospin er ikke omtalt i retningslinjer fra WHO eller ECDC.

**Forslag til konklusjon:**

Strategimøtet mener at det ikke er tilstrekkelig evidens til å gi en klar anbefaling på dette punktet. Det får bli opp til hvert enkelt laboratorium om man ønsker å ta metoden i bruk.

Prøvepreparering uten P3 fasiliteter:

Hovedregelen i henhold til Arbeidsmiljøloven er at arbeid med mikroorganismer tilhørende smitterisikogruppe 3 skal foregå i laboratorium med inneslutningsnivå 3. Mykobakterier tilhørende M.tuberculosis komplekset tilhører smitterisikogruppe 3.

Man må imidlertid skille mellom arbeid med prøvematerialer og arbeid med kultur. De fleste prøvematerialer kan potensielt inneholde mikroorganismer i smitterisikogruppe 3. I alle de vedlagte referansene (5,6, 7, 15, 16 og 17) anbefales det at prøvematerialer til mykobakteriedyrkning skal håndteres i biologisk sikkerhetskabinett. Inneslutningsnivå 3 er ikke nødvendig. I flere av referansene fremgår det at laboratoriene må gjøre en risikovurdering basert på prøvevolum, hvilke prosedyrer som utføres, forekomst av Tb i området og hyppighet av multiresistens. For laboratorier med lav risiko vil inneslutningsnivå 2 være tilstrekkelig for håndtering av prøvematerialer til mikroskopi eller PCR. Alle referansene synes å være enige om at inneslutningsnivå 3 er nødvendig ved håndtering av kulturer.

**Forslag til konklusjon:**

Laboratorier som ikke har inneslutningsnivå 3 kan likevel utføre direkte mikroskopi og PCR-undersøkelse på prøvematerialet. Dette forutsetter at all håndtering av prøvematerialet forgår i biologisk sikkerhetskabinett.

Dette temaet ble også tatt opp i Strategirapporten «Sikkerhetsregler og smitteforebygging i medisinsk mikrobiologiske laboratorier» fra 1999. Konklusjonen den gang var den samme som foreslås nå.

Antall synsfelt som bør undersøkes:

I henhold til Clinical Microbiology Procedures Handbook (6) skal 300 synsfelt mikroskoperes i industrialiserte land. Denne referansen skiller ikke mellom ulike fargemetoder. I Manual of



Clinical Microbiology (7) står det at 300 synsfelt bør mikroskoperes når ZN-metode benyttes, men ettersom man ved IF-metode benytter lavere forstørrelse vil 30 synsfelt være tilstrekkelig i dette tilfellet. I henhold til Stop Tb (1) bør 100 synsfelt mikroskoperes ved ZN-metode (1 langside av preparatet), og undersøkelsen skal ta ca 5 minutter. Ved fluorescensfarging står det at denne skal mikroskoperes med 20x objektiv, og at 1 langside skal undersøkes. Det er ikke oppgitt krav til antall synsfelt med denne metoden. I retningslinjene fra ECDC (5) anbefales det at man ved ZN-metode undersøker 1 langside, tilsvarende 100 synsfelt før undersøkelsen rapporteres som negativ. Ved IF anbefales det også å undersøke en langside, noe som tilsvarer 30 synsfelt ved 20 x forstørrelse, og 40 synsfelt ved 40 x forstørrelse. Det anbefales å screene med 20x forstørrelse, og bekrefte eventuelle funn med 40 x forstørrelse.

**Forslag til konklusjon:**

Strategimøtet velger å slutte seg til anbefalingene fra ECDC. 100 synsfelt ved ZN-metode, ca 5 minutters tidsbruk per preparat virker fornuftig. Ved IF mikroskopi vil 30 og 40 synsfelt være tilstrekkelig, med henholdsvis 20- og 40 x forstørrelse.

### Hvordan skal funnet kvantiteres?

Stop TB:

ZN Antall syrefaste staver	IF (20 1   x forstørrelse) Antall syrefaste staver	IF (40 x forstørrelse) Antall syrefaste staver	
	1-4 per lengde	1-2 per lengde	Bekreftelse påkrevd*
1-9 per 100 synsfelt	5-49 per lengde	3-24 per lengde	Sparsomt, angi antall
10-99 per 100 synsfelt	3-24 per synsfelt	1-6 per synsfelt	1+
1-10 per synsfelt (minst 50 felt)	25-250 per synsfelt	7-60 per synsfelt	2+
>10 per synsfelt (minst 20 felt)	>250 per synsfelt	>60 per synsfelt	3+

\* Bekreftet av annen avleser eller med nytt preparat.

I denne anbefalingen er antall syrefaste staver ved IF-metoden rekalkulert, fordi synsfeltet som sees angivelig er større enn tidligere antatt.

Journal of Clinical Microbiology og Clinical Procedures Handbook har samme anbefaling:

ZN Antall syrefaste staver	IF (25 x forstørrelse) Antall syrefaste staver	IF (45 x forstørrelse) Antall syrefaste staver	
1-2 per 300 synsfelt	1-2 per 30 synsfelt	1-2 per 70 synsfelt	Usikkert, gjenta
1-9 per 100 synsfelt	1-9 per 10 synsfelt	2-18 per 50 synsfelt	1+
1-9 per 10 synsfelt	1-9 per synsfelt	4-36 per 10 synsfelt	2+
1-9 per synsfelt	10-90 per synsfelt	4-36 per synsfelt	3+
>9 per synsfelt	>90 per synsfelt	>36 per synsfelt	4+

ECDC:

ZN Antall syrefaste staver	IF (20 x forstørrelse) Antall syrefaste staver	IF (40 x forstørrelse) Antall syrefaste staver	
1-9 per 100 synsfelt	1-29 per lengde	1-19 per lengde	Sparsomt, angi antall
10-99 per 100 synsfelt	30-299 per lengde	2-199 per lengde	1+
1-10 per synsfelt (minst 50 felt)	10-100 per synsfelt	5-50 per synsfelt	2+
>10 per synsfelt (minst 20 felt)	>100 per synsfelt	>50 per synsfelt	3+

**Forslag til konklusjon:**

Strategimøtet beslutter å følge de europeiske anbefalingene. Det er en fordel at kvantiteringen er standardisert, både for sammenligning laboratorier imellom, og ved deltakelse i europeiske kvalitetskontroller. (Valg av metode må sees i sammenheng med konklusjon angående antall synsfelt.)

Rapportering av resultat på prøvesvar:**Forslag til konklusjon:**

Funnet bør kvantiteres og antall syrefaste staver per synsfelt bør angis.

Hvilke prøvematerialer bør rutinemessig mikroskoperes?

Vanskelig å finne litteratur om dette. I henhold til Clinical Microbiology Procedures skal luftveismateriale alltid mikroskoperes, kanskje også sterile kroppsvæsker og vev. Verdien av å mikroskopere gastrisk aspirat, pleuravæske og urin er omdiskutert. ECDC skriver i sin veileder at det ikke er anbefalt å mikroskopere blodige prøvematerialer pga lav sensitivitet. Mikroskopi av urin anbefales ikke pga apatogene syrefaste organismer som koloniserer urogenitaltraktus.

**Forslag til konklusjon:**

Strategimøtet anbefaler at luftveismateriale fra pasienter med mistanke om smittsom lungetuberkulose mikroskoperes. Urinprøver bør ikke mikroskoperes. Mikroskopi av sterile kroppsvæsker og vevsprøver er lite sensitivt, men bør vurderes hos pasienter med sterk mistanke om mykobakterieinfeksjon.

(Anbefalingen gjelder for laboratorier som benytter mikroskopi som primærmetode for direktepåvisning)

Retningslinjer for isolering

I henhold til Tuberkuloseveilederen (18) kan isolering oppheves dersom tresputumprøver eller en BAL er negativ ved direkte mikroskopi (dersom det ikke er mistanke om multiresistent tuberkulose). WHO anbefaler imidlertid nå at antallet sputumprøver reduseres til to. WHO skriver i sin rapport (8) at grundig mikroskopi av to sputumprøver identifiserer 95-98% av mikroskopi-positive pasienter. ECDC skriver i sine anbefalinger at minst 2 prøver bør undersøkes.

**Forslag til konklusjon:**

Strategimøtet mener at tuberkulosekomiteen bør vurdere om nasjonale anbefalinger skal endres i tråd med anbefalingene fra WHO og ECDC. En eventuell anbefaling om at to prøver er tilstrekkelig forutsetter at prøvematerialet er av god nok kvalitet, og at laboratoriene gir tilbakemelding til sine rekvirenter om dette.

Referanser

- 1) Laboratory Diagnosis of Tuberculosis by Sputum Microscopy. The handbook. Global edition. A publication of the Global Laboratory Initiative a Working Group of the Stop TB Partnership. Lumb R, Van Deun A, Bastian I, Fitz-Gerald M. 2013 SA Pathology
- 2) Steingart et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. Lancet Infect Dis 2006; 6: 570-81

- 3) Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis ([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44602/1/9789241501613\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44602/1/9789241501613_eng.pdf?ua=1))
- 4) Griffith DE et al. An official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Feb 15;175(4):367-416
- 5) European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union, Stockholm: ECDC; 2016.
- 6) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Third edition. ASM Press, Washington DC, USA. 2010.
- 7) *Manual of Clinical Microbiology*. 10<sup>th</sup> edition. ASM Press, Washington DC, USA. 2011.
- 8) WHO Implementing tub diagnostics 2014 ([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162712/1/9789241508612\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162712/1/9789241508612_eng.pdf))
- 9) Canadian Tuberculosis Standards. 7<sup>th</sup> Edition. Chapter 3: Diagnosis of Active Tuberculosis and Drug Resistance. ([http://www.respiratoryguidelines.ca/sites/all/files/CTB\\_Standards\\_EN\\_Chapter%203.pdf](http://www.respiratoryguidelines.ca/sites/all/files/CTB_Standards_EN_Chapter%203.pdf))
- 10) CDC 2000: Diagnostic standards and classification of TB in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:1376-95.
- 11) Saceanu CA et al. Evaluation of Sputum Smears Concentrated by Cytocentrifugation for Detection of Acid-Fast Bacilli. *J Clin Microbiol.* 1993 Sep;31(9):2371-4.
- 12) Woods GL et al. Concentration of sputum by Cyto-centrifugation for Preparation of Smears for Acid-Fast Bacilli Does not increase Sensitivity of the Fluorochrome Stain. *J Clin Microbiol.* 1995 Jul;33(7):1915-6.
- 13) Fodor T. Detection of mycobacteria in sputum smears prepared by cyto-centrifugation and sedimentation. *Tuber Lung Dis.* 1995 Jun;76(3):273-4.
- 14) Zheng LH et al. Modified cytospin slide microscopy method for rapid diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2016 Apr;20(4):456-61.
- 15) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. CDC 2009. (<https://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/>)
- 16) Sikkerhetsregler og smitteforebygging i medisinsk mikrobiologiske laboratorier. Strategirapport bakteriologi, FHI. 1999
- 17) Tuberculosis laboratory biosafety manual. Geneva: WHO;2012.WHO/HTM/TB/2012.11. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77949/1/9789241504638\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77949/1/9789241504638_eng.pdf)
- 18) Tuberkuloseveilederen, FHI (<https://www.fhi.no/nettpub/tuberkuloseveilederen/>)
- 19) Same-day diagnosis of tuberculosis by microscopy. WHO policy statement. 2011. ([http://www.who.int/tb/publications/2011/tb\\_microscopy\\_9789241501606/en/](http://www.who.int/tb/publications/2011/tb_microscopy_9789241501606/en/))

## 2.4 Nukleinsyre amplifikasjonstester direkte i prøvematerialet

Heidi Syre, Avdeling for medisinsk mikrobiologi, Stavanger universitetssykehus

### Sensitivitet og spesifisitet til nukleinsyre amplifikasjonstester for påvisning av *Mycobacterium tuberculosis* komplekset i ulike prøvematerialer

Nukleinsyre amplifikasjonstester (NAATs) utført direkte på prøvematerialet kan påvise *Mycobacterium tuberculosis* komplekset (MTBC) timer etter prøvetakning. Det finnes både in-house og kommersielt tilgjengelige NAATs for påvisning av MTBC. De fleste av dagens kommersielt tilgjengelige tester er kun godkjente for prøver fra nedre luftveier. Xpert MTB/RIF er den mest brukte testen på markedet og mange av de nyere studiene som har vurdert NAATs for påvisning av MTBC har brukt Xpert MTB/RIF i populasjoner med høy forekomst av tuberkulose (TB). Det er usikkert om data fra Xpert MTB/RIF gjelder for alle NAATs og for populasjoner med lav forekomst av TB.

Prøvemateriale	Sensitivitet %	Spesifisitet %
Ekspektorat fra voksne, uavhengig av mikroskopifunn	85-89	96-99
Ekspektorat fra voksne, mikroskopi positive	96-98	97
Ekspektorat fra voksne, mikroskopi negative	66-73	94-99
Ekspektorat fra voksne, HIV positive	79-80	98
Ekspektorat fra barn	62-66	98
Gastrisk lavage fra barn	66	98
Spinalvæske	56-81	96-99
Lymfeknuteaspirat/vev	80-87	92-96
Pleuravæske	37-73	94-99
Gastrointestinale vevsprøver	86	98
Genitouretrale prøver	70-77	94-98

Tabell 1. Sensitivitet og spesifisitet til NAATs for ulike prøvematerialer med dyrkning som referansem metode (1-11).

Tabell 1 viser sensitivitet og spesifisitet til NAATs for ulike prøvematerialer. For mikroskopi positive, dyrkning positive ekspektoratprøver er sensitiviteten til NAATs for påvisning av MTBC høy (>95%). For mikroskopi negative, dyrkning positive prøver er sensitiviteten lavere. Sensitiviteten er også lavere i ekstrapulmonale prøver og varierer avhengig av type prøvemateriale. Sensitiviteten til NAATs i ekspektoratprøver fra barn og HIV positive er lav fordi bakteriemengden som utskilles hos disse pasientgruppene varierer mer enn hos HIV negative voksne. Et negativ testresultat i NAATs utelukker ikke tilstedeværelsen av MTBC og prøven må alltid dyrkes i tillegg.

Spesifisiteten for direkte NAATs er høy i alle typer prøver (92-99%). Likevel vil det forekomme falsk positive resultater. For å minimere risikoen for falsk positive resultater er det viktig at analysen ikke utføres uten at det foreligger en reell pretest sannsynlighet for MTBC infeksjon.

## Hvilke prøvemateriale bør undersøkes rutinemessig ved NAATs og eventuelt hvor mange?

### Forslag til anbefalinger:

- 1) *Prøver fra nedre luftveier*
  - a. For laboratorier som primært bruker NAAT til hurtigdiagnostikk  
- NAAT skal rutinemessig utføres på 2 prøver fra pasienter med symptomer på lunge-TB hvor diagnosen er mistenkt men ikke bekreftet, og hvor testresultatet vil føre til endring i behandling eller smitteverntiltak. Det bør gjøres direkte mikroskopisk undersøkelse på alle NAAT positive prøver for å vurdere smittsomhet.
  - b. For laboratorier som primært bruker mikroskopisk undersøkelse til hurtigdiagnostikk  
- NAAT skal rutinemessig utføres på minst 1 prøve fra pasienter med mistenkt multiresistent (MDR) – eller HIV assosiert lunge-TB. Ved mistenkt MDR-TB skal NAAT inkludert påvisning av mutasjoner assosiert med rifampicin resistens utføres. Ved høy mistanke om lunge-TB hos disse pasientgruppene og negativ resultat i første prøve, bør det vurderes å analysere prøve nummer to.  
- NAAT bør rutinemessig utføres på 1 mikroskopi positiv prøve fra pasienter med symptomer på lunge-TB hvor diagnosen er mistenkt men ikke bekreftet, for å utelukke NTM-infeksjon.  
- Ved 3 mikroskopi negative prøver men likevel høy mistanke om lunge-TB bør det vurderes å gjøre NAAT på 1 prøve for å få en tidlig diagnose.
- 2) *Ekstrapulmonale prøver:*
  - a. Siden ekstrapulmonal TB ikke er smittsom og dagens NAATs ikke er godkjente for ekstrapulmonalt prøvemateriale, er det ikke et krav at ekstrapulmonale prøver rutinemessig blir undersøkt med NAAT. Hvorvidt det bør gjøres NAAT avhenger av flere faktorer, blant annet pretest sannsynlighet for TB, alvorlighetsgrad av symptomer og immunstatus. Ved høy pretest sannsynlighet for MDR-TB bør NAAT inkludert påvisning av mutasjoner assosiert med rifampicin resistens utføres.
  - b. Det bør gjøres NAAT på spinalvæsker fra pasienter med mistenkt TB meningitt. Ved lite prøvemateriale bør NAAT prioriteres foran mikroskopi, men dyrkning bør tilstrebes.
- 3) *Prøver fra alle lokalisasjoner:*
  - a. Det anbefales at negative analysesvar i NAATs gir et forbehold i svar til rekvirent om at det ikke utelukker tilstedeværelse av MTBC i prøven.
  - b. Prøven bør dyrkes selv om NAAT utføres. Dyrkning er referansem metode for påvisning av MTBC og nødvendig for resistenstesting og genotyping.
  - c. Det anbefales at alle laboratorier som utfører dyrkning med tanke på mykobakterier også utfører NAAT for påvisning av MTBC.

### **Prøver fra nedre luftveier**

WHO anbefaler Xpert MTB/RIF som første diagnostiske test fremfor mikroskopisk undersøkelse og dyrkning på luftveisprøver fra pasienter med høy risiko for MDR-TB eller ved HIV-assosiert TB hos voksne (sterk anbefaling, høy beviskvalitet) og barn (sterk anbefaling, svært svak beviskvalitet) [5]. Videre sier WHO at Xpert MTB/RIF kan brukes som første diagnostiske test på luftveisprøver fra alle voksne (betinget anbefaling, høy beviskvalitet) og barn (betinget anbefaling, svært lav beviskvalitet) med mistenkt TB. WHO

sine anbefalinger er et resultat av systematisk gjennomgang og meta-analyser av eksisterende publikasjoner som har vurdert Xpert MTB/RIF frem til 2013 (5). Anbefalingene er basert på at Xpert MTB/RIF har høyere sensitivitet enn mikroskopisk undersøkelse og gir et vesentlig raskere testresultat enn dyrkning. NAATs kan bekrefte tilstedeværelsen av MTBC i 66-73% av mikroskopi negative, dyrkning positive prøver (Tabell 1). Særlig hos HIV-positive personer er det viktig å få utført NAATs fordi de ofte har mikroskopi negative ekspektoratprøver (5). Spesifisiteten er også høyere ved NAATs enn ved mikroskopisk undersøkelse med tanke på påvisning av MTBC, særlig i områder med lav TB prevalens hvor syrefaste staver sett ved mikroskopisk undersøkelse ofte kan være NTM. NAAT bør ikke utføres rutinemessig på prøver fra pasienter med lav klinisk mistanke om TB fordi positiv prediktiv verdi for NAATs ved slike tilfeller er <50% (11). Alle luftveisprøver som er positive i NAAT bør mikroskoperes for vurdering av smittsomhet. Mikroskopisk undersøkelse og dyrkning er førstevalgene ved vurdering av behandlingseffekt.

Selv om NAATs er vesentlig dyrere enn mikroskopisk undersøkelse, kan testene være kostnadseffektive ved å bruke resultatet til prioriteringer innen smittesporing, avgjøre spørsmål om isolering og å hindre oppstart av behandling hvor det ikke er indisert (12). For laboratorier med få prøver, kan tilgjengeligheten av NAATs være begrenset og videresending av pasientprøver til større laboratorier kan være å foretrekke (12).

### **Ekstrapulmonale prøver**

Dagens NAATs har forholdsvis lav og varierende sensitivitet ved analyse av ekstrapulmonalt prøvemateriale. Testene er derfor ikke godkjente for ekstrapulmonalt prøvemateriale. Hvorvidt det bør gjøres NAAT avhenger av flere faktorer, blant annet pretest sannsynlighet for TB og MDR-TB, alvorlighetsgrad av symptomer og immunstatus. I følge WHO er Xpert MTB/RIF å foretrekke fremfor mikroskopisk undersøkelse og dyrkning på spinalvæsker ved mistenkt TB meningitt dersom det er lite prøvevolum tilgjengelig (sterk anbefaling gitt behovet for rask diagnose, svært lav beviskvalitet) [5]. Spinalvæsker bør oppkonsentreres før analyse dersom det er nok prøvevolum (6). WHO sier videre at Xpert MTB/RIF kan brukes som erstatning for mikroskopi eller dyrkning ved undersøkelser av lymfeknuter og annet vev fra pasienter med mistenkt ekstrapulmonal TB (betinget anbefaling, svært lav beviskvalitet) (5). Ved lavt prøvevolum og alvorlig klinikk kan NAATs være fordelaktig for å få et raskt prøvesvar, men uten dyrkning kan det ikke gjøres fenotypisk resistensbestemmelse eller genotyping. Det anbefales derfor at ekstrapulmonale prøver dyrkes rutinemessig. NAAT kan gjøres i tillegg dersom prøvevolum tillater det. Anbefalingene gjelder ikke avføring, urin og blod da det er begrensede data på disse prøvematerialene. Pleuravæske er suboptimalt prøvemateriale med lav sensitivitet uavhengig av diagnostisk test. Pleurabiopsi er å foretrekke.

### **Antall prøver**

Det er anbefalt at NAAT utføres på minst 1 luftveisprøve fra hver pasient med symptomer på lunge-TB hvor TB diagnosen er mistenkt men ikke bekreftet, og hvor testresultatet vil føre til endringer i behandling eller smitteverntiltak (5, 12). Analyse av flere prøver øker sensitiviteten noe, men også kostnadene. Boehme og medarbeidere (13) har vist at sensitiviteten til Xpert MTB/RIF økte fra 92.2% til 96% ved analyse av 2 ekspektoratprøver i stedet for én. Analyse av 3 ekspektoratprøver gav en sensitivitet på 97.6%. For mikroskopi positive prøver var sensitiviteten 98.2% ved analyse av 1 prøve, 99.4% ved analyse av 2 prøver og 99.8% ved analyse av 3 prøver. For mikroskopi negative prøver var tilsvarende tall

72.5%, 85.1% og 90.2%. Spesifisiteten var høy uavhengig av antall prøver (98-99%). Tallene er bekreftet i en multisenterstudie (14). Et negativt testresultat i NAATs utelukker ikke infeksjon med MTBC. Hos personer med høy sannsynlighet for TB selv etter en negativ NAAT, må det vurderes om det skal gjøres flere diagnostiske tester, inkludert analyse av en ny prøve ved NAAT (6).

### **Preparering av prøve for NAATs og sikkerhet i laboratoriet uten P3 fasiliteter**

#### Forslag til anbefalinger:

*Minimum sikkerhetstiltak ved preparering av kliniske prøver for NAATs er arbeid i sikkerhetsavtrekk i et laboratorium med inneslutningsnivå 2 fasiliteter forutsatt at sikkerhetsavtrekket er velfungerende og blir kontrollert regelmessig.*

*Det enkelte laboratoriet må gjøre en egen risikovurdering av prosedyrene som utføres ved prepareringen, særlig med tanke på risiko for aerosoldannelse, og utføre sikkerhetstiltak som er tilpasset de enkelte prosedyrene.*

I 2012 kom WHO med oppdaterte retningslinjer for minimumsnivå av sikkerhetstiltak ved arbeid med MTBC i laboratorier (15). Selv om MTBC tilhører smitterisikogruppe 3, krever ikke alle prosedyrer inneslutningsnivå 3 fasiliteter. WHO deler arbeidsprosedyrene inn i lav, moderat og høy risiko for smitte avhengig av prosedyrenes risiko for å danne aerosoler og mengde bakterier i materialet som blir prosessert. Risiko for smitte ved inaktivering av prøver før de tilsettes beholdere for helautomatiserte NAATs (for eksempel Xpert MTB/RIF) er vurdert som lav. Risikoen for smitte ved forbehandling og konsentrering av prøver for dyrkning og utførelse av resistensbestemmelse direkte i prøvematerialet (for eksempel line-probe assay på forbehandlet ekspektorat) vurderes som moderat (15). Minimum sikkerhetstiltak ved moderat smitterisiko er at arbeidet utføres i sikkerhetsavtrekk i et laboratorium med inneslutningsnivå 2 fasiliteter (15-17).

### **Hva er gjeldende retningslinjer for isolering?**

I følge Tuberkuloseveilederen (18) anbefales iverksatt isolering på luftsmitteisolat ved:

- 1) Mistenkt eller bekreftet smittsom TB. Smittsom TB defineres som positiv direkte mikroskopisk undersøkelse av prøve fra nedre luftveier før effektiv behandling ergitt i minst 14 dager
- 2) Mistenkt eller bekreftet MDR lunge-TB
- 3) Svært lite smittsom TB når pasienten ikke kan behandles utenfor sykehus og det behandles pasienter med alvorlig immunsvikt på sykehusavdelingen. Svært lite smittsom TB defineres som negativ NAAT eller direkte mikroskopisk undersøkelse i 3 ekspektoratprøver (3-prøvestrategi) eller én BAL, eller etter 14 dagers behandling med god klinisk respons selv om mikroskopisk undersøkelse fortsatt er positiv, dersom det ikke er mistanke om MDR-TB

Isolering på luftsmitteisolat kan i følge Tuberkuloseveilederen oppheves:

- 1) Når det ikke er mistanke om MDR lunge-TB og pasienten er
  - a. Svært lite smittsom og kan skrives ut
  - b. Svært lite smittsom, men må bli på sykehus av medisinske eller sosiale årsaker, og det ikke behandles pasienter med alvorlig immunsvikt på avdelingen
- 2) Ved mistenkt eller bekreftet MDR-TB når
  - a. Det foreligger 3 negative dyrkningsprøver fra sputum eller én BAL



Ved utredning av asylsøkere i asylmottak aksepteres negativ PCR i én sputumprøve eller negativ direkte mikroskopi i 3 sputumprøver, forutsatt god prøve kvalitet (18). Hvis et av disse kriteriene er oppfylt, er det ikke behov for enerom frem til dyrkningssvar foreligger. Ekstrapulmonal TB er ikke smittsom med mindre det utføres aerosoldannende inngrep på det affiserte organ (18).

### **Hvor mange prøver med negativt NAAT resultat skal til for å oppheve isolering av pasient med mistenkt lunge-TB?**

#### Forslag til anbefaling:

*Det anbefales at avisolering kan vurderes hos pasienter med mistenkt men ikke påvist lunge-TB når 2 ekspektoratprøver eller 1 BAL er negativ i NAAT. Anbefalingen forutsetter at prøvene er av god kvalitet. Anbefalingen gjelder kun for avisolering av personer med mistenkt TB. For pasienter med påvist TB skal avgjørelsen om oppheving av smitteverntiltak baseres på resultat fra mikroskopisk undersøkelse.*

Dagens anbefaling (3-prøvestrategi) for avisolering av pasient med mistenkt men ikke bekreftet lunge-TB i Norge er i samsvar med internasjonale retningslinjer. Amerikanske retningslinjer fra CDC anbefaler at avisolering kan vurderes når en pasienten har 3 mikroskopi negative ekspektoratprøver tatt med 8-24 timers mellomrom, hvorav minst én prøve er fastende morgenprøve (19). I tillegg må det gjøres en klinisk vurdering om avisolering er forsvarlig. I følge CDC kan én undersøkelse i NAAT erstatte én mikroskopisk undersøkelse siden den negative prediktive verdien ved NAAT er høyere enn ved mikroskopisk undersøkelse (19).

Siden testresultat fra NAATs kan foreligge kun timer etter prøvetakning, er det den siste tiden diskutert om gjeldende retningslinjer for avisolering er optimale. Som et resultat av dette godkjente US Food and Drug Administration (FDA) i 2015 Xpert MTB/RIF for bruk ved avisolering. Xpert MTB/RIF resultat fra én eller to ekspektoratprøver kan brukes som et alternativ til 3-prøvestrategien for avisolering av pasienter med mistenkt lunge-TB (20). Godkjennelsen er basert på flere studier som har vist at Xpert MTB/RIF utført på én eller to ekspektoratprøver har samme eller høyere sensitivitet og negativ prediktiv verdi (99-100%) enn 3-prøvestrategien for påvisning av MTBC når dyrkning er brukt som referanse (13, 21-23). Flere av disse studiene ble gjort i områder med lav forekomst av TB (21-23). Et negativt Xpert MTB/RIF resultat gav en negativ prediktiv verdi for fravær av mikroskopi positiv, dyrkning positiv TB på 99.7% (21). Analyse av 2 prøver gav en negativ prediktiv verdi på 100%. Videre var isolasjonstiden ved bruk av Xpert MTB/RIF kortere enn ved mikroskopisk undersøkelse (20.8 timer for første prøve, 41.2 timer for andre prøve og 54 timer for tredje prøve ved Xpert MTB/RIF, 68 timer for mikroskopisk undersøkelse av 3 prøver) og arbeidstiden på laboratoriet var 2.5 ganger kortere for Xpert MTB/RIF sammenlignet med mikroskopisk undersøkelse (23). Mikroskopisk undersøkelse ble gjort én gang daglig i ukedager, ikke helg. Xpert MTB/RIF ble gjort to ganger daglig (kl 9 og 17) i ukedager, ikke helg. Ved å redusere antall dager i isolat kan NAATs føre til betydelig kostnadsbesparelser for sykehus i områder med lav forekomst av TB (24).

## **Bør svarbrevet til rekvirent ha kommentar om at positiv resultat i NAATs må bekreftes med dyrkning?**

### Forslag til anbefaling:

*Ved MTBC påvist direkte i prøvematerialet ved NAATs er det ikke nødvendig at svarbrevet til rekvirent kommenteres. Anbefalingen forutsetter at kun prøver fra pasienter med reell mistanke om TB testes. Det anbefales at positive resultat i NAATs meldes MSIS.*

Til tross for at NAATs har høy spesifisitet for påvisning av MTBC, vil det forekomme falsk positive resultat. Positiv prediktiv verdi avhenger av prevalensen av TB i populasjonen som undersøkes. Det er derfor viktig kun å utføre NAAT på pasienter med en reell pretest sannsynlighet for TB slik at risikoen for falsk positive resultat reduseres. I følge WHO skal et positiv resultat i Xpert MTB/RIF regnes som bakteriologisk bekreftet TB (6), men disse anbefalingene er først og fremst rettet mot områder med høy forekomst av TB. Heller ikke ECDC eller CDC sier at svarbrevet bør advare mot falsk positive resultat (16, 19). Det anbefales likevel at det alltid gjøres en vurdering av pretest sannsynlighet ved positiv NAAT resultat.

## **Bør NTM påvises direkte i prøvematerialet ved hjelp av NAAT?**

### Forslag til anbefaling:

*Det kreves ikke rutinemessig påvisning av NTM direkte i prøvematerialet ved hjelp av NAAT.*

NTM som årsak til infeksjon er økende, trolig på grunn av økende antall immunsupprimerte personer. Siden det antas at NTM ikke smitter mellom mennesker men NTM klinisk kan ligne lunge-TB, vil en rask avklaring om syrefaste staver sett ved mikroskopisk undersøkelse tilhører MTBC eller NTM ha konsekvenser for behandling og smitteverntiltak. Videre er det fordelaktig med rask påvisning av NTM på species nivå siden ulike NTM kan kreve ulike behandling. De fleste publikasjoner om NAATs og NTM er utført på kliniske NTM-isolat. De siste årene har det kommet publikasjoner hvor det er utført NAATs for identifikasjon av NTM på species-nivå direkte i prøvematerialet (25-29). Noen av studiene viser lovende resultater, men de fleste studier er små og av varierende kvalitet. Flere studier må til før det kan gis anbefalinger på dette området.

## **Referanser**

1. Steingart KR, et al. Xpert MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults (Review). The Cochrane collaboration. The Cochrane Database Syst Rev 2014;21:1-166.
2. Greco S, et al. The current evidence on diagnostic accuracy of commercial based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Thorax 2006;61;783-90.
3. Pai M, et al. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis pleuritic: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis 2004;4:6.
4. Pai M, et al. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculosis meningitis: a systemic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2003;3:633-43.
5. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children: policy update. Geneva, World Health Organization 2013. WHO/HTM/TB/2013.16.
6. Xpert MTB/RIF implementation manual. Technical and operational "how-to" practical considerations. Geneva, World Health Organization 2014. WHO/HTM/TB/2014.1.

7. Ling DI, et al. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. PLoS ONE 2008;3:e1536.
8. Denkinger CM, et al. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systemic review and meta-analysis. Eur Respir J 2014;44:435-46.
9. Penz E, et al. Diagnostic accuracy of the Xpert MTB/RIF assay for extra-pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. Int J Tuberc Lung Dis 2015;19:278-84.
10. Detjen AK, et al. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children: a systematic review and meta-analysis. Lancet Respir Med 2015;3:451-61.
11. Dinnes J, et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. Health technol Assess 2007;11:1-196.
12. CDC. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. MMWR 2009;58:7-10.
13. Boehme CC, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N Engl J Med 2010;363:1005-15.
14. Boehme CC, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralized use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicenter implementation study. Lancet 2011;377:1495-505.
15. Tuberculosis laboratory biosafety manual. World Health Organization 2012. WHO/HTM/TB/2012.11.
16. ECDC technical document. Handbook on TB laboratory diagnostic methods in the European Union. European Centre for Disease prevention and Control 2016. Doi10.2900/216384.
17. CDC. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5<sup>th</sup> edition. 2007.
18. Tuberkuloseveilederen. Folkehelseinstituttet (<http://www.fhi.no/nettpub/tuberkuloseveilederen>).
19. CDC. Availability of an assay for detecting *Mycobacterium tuberculosis*, including rifampin-resistant strains, and considerations for its use – United States, 2013. MMWR2013;62:821-4.
20. CDC. Revised device labeling for the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for detecting *Mycobacterium tuberculosis*. MMWR 2015;64:193.
21. Leutkemeyer AF, et al. Evaluation of Xpert MTB/RIF versus AFB smear and culture to identify pulmonary tuberculosis in patients with suspected tuberculosis from low and higher prevalence settings. Clin Infect Dis 2016;62:1081-8.
22. Chaisson LH, et al. Impact of GeneXpert MTB/RIF assay on triage of respiratory isolation rooms for inpatients with presumed tuberculosis: a hypothetical trial. Clin Infect Dis 2014;59:1353-60.
23. Lippincott CK, et al. Xpert MTB/RIF assay shortens airborne isolation for hospitalized patients with presumptive tuberculosis in the United States. Clin infect Dis 2014;59:186-92.
24. Millman AJ, et al. Rapid molecular testing for TB to guide respiratory isolation in the U.S: A cost-benefit analysis. PLoS ONE 2013;8:issue 11,e79669.
25. Kim JU, et al. Direct identification of mycobacteria from clinical specimens by multiplex real-time PCR. J Appl Microbiol 2015;118:1498-506.
26. Wang HY, et al. Identification of *Mycobacterium* species in direct respiratory specimens using reverse blot hybridization assay. Int J Tuberc Lung Dis 2014;18:1114-20.
27. Choi YJ, et al. Evaluation of peptide nucleic acid probe-based real-time PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens. Ann Lab Med 2012;32:257-63.
28. Liu J, et al. Performance assessment of the CapitalBio mycobacterium identification array system for identification of mycobacteria. J Clin Microbiol 2012;50:76-80.
29. Park JS, et al. The combination of real-time PCR and HPLC for the identification of non-tuberculous mycobacteria. Ann Lab Med 2013;33:349-52.

## 2.5 Dyrkning av mykobakterier

Tone Tønjum, Avdeling for mikrobiologi, Oslo universitetssykehus, Universitetet i Oslo  
Epost: tone.tonjum@medisin.uio.no

### Forslag til anbefalinger:

1. Alle prøver som undersøkes med hensyn på mykobakterier bør dyrkes i flytende MGIT medium med BACTEC MGIT utstyr (BD) med semi-automatisert døgnavlesning, ifølge internasjonale retningslinjer fra WHO (1) og CDC (2).
2. Bredt utvalgte prøver dyrkes parallelt på både flytende og faste medier (Middlebrook 7H10 eller LJ-G) og ved ulike temperaturer. Det gjelder benmarg, blodkulturer, spinalvæske, biopsier og andre viktige, sterile materialer.
3. ECDC anbefaler i 2016 at alle mykobakterieprøver dyrkes parallelt på både flytende og faste medier (3). Imidlertid er anbefalingen ikke nærmere begrunnet.

### Innledning

Dyrkning av mykobakterier er viktig av flere grunner, ikke minst fordi metoden er mer sensitiv enn direkte mikroskopi, idet nedre deteksjonsgrense for dyrkning er cirka 10 bakterier/ml. Dyrkning er også nødvendig for å kunne utføre resistensbestemmelse og typing av pasientenes isolater (4).

*Mycobacterium tuberculosis* har en generasjonstid på 18–24 timer (mens andre bakterier kan dele seg innen 20 minutter), noe som påvirker metodene som brukes ved dyrkning av mykobakterier. Tuberkulosebakteriene og noen atypiske mykobakterier vokser så langsomt at det kan ta opp til seks uker før det kommer oppvekst ved dyrkning. Prøver som skal dyrkes, dekontamineres med NALC/2%NaOH-løsning når det kliniske materialet er fra områder med normalflora, for å hindre overvekst av andre mikrober enn mykobakterier (5). Fra prøver med store mengder mykobakterier kommer det vanligvis raskere vekst enn fra prøver med få bakterier.

### Status for mykobakteriedyrkning i 2016

#### 1. Dyrkningsmedier

Mange ulike medier har blitt utviklet for dyrkning av mykobakterier og er generelt klassifisert i to hovedgrupper: flytende medier og faste medier (egg- eller agar-baserte) (Tekstboks 1 og 2).

**1.1 Flytende medier.** De fleste laboratorier i Norge benytter flytende medier for primær dyrkning av mykobakterier fra kliniske prøver (1). Den mest utbredte utstyrsmodellen for dyrkning av mykobakterier i flytende medier er BACTEC MGIT 960 (Beckton Dickinson, BD) (Fig. 1). Her er inkubering og semi-automatisert døgnavlesning i samme system og utføres i tråd med internasjonale retningslinjer fra WHO (1) og CDC (2) (Tekstboks 3). MGIT-rørene inneholder modifisert Middlebrook 7H9 buljong og et vekst-supplement som BD har utviklet videre de senere år. Antibiotika i form av PANTA (polymyxin B, amphotericin B, nalidiksinsyre, trimethoprim og azlocillin) tilsettes flytende vekstmedium for å hindre overvekst av normalflora og andre mikrober enn mykobakterier. Hvert MGIT-rør tilsettes 0.5 ml prøvemateriale og 0.8 ml PANTA og blandes godt før inkubering. Andre vanlige kommersielt tilgjengelige automatiserte systemer for hurtig påvisning av mykobakterier i flytende medium er ESP Culture System II (Trek Diagnostic Systems) og MB/BacT (bioMérieux) (5). Disse undersøkelsesmetodene registrerer vekst av mykobakterier i flytende medium i realtid ved automatisk avlesning hver time. I BACTEC 960-systemet og ESP Culture System II blir mykobakterie-vekst registrert ved mengden O<sub>2</sub> som forbrukes når mikrobene

vokser i medium tilsatt egnet fluorescens-indikator, mens det i MB/BacT-systemet er en kolorimetrisk sensor som måler produksjonen av CO<sub>2</sub> som dannes og blir løst i kulturmediet. Allerede etter 1-2 uker kan vekst ofte påvises, det vil si en innsparing på mellom 1 og 2 uker sammenlignet med dyrkning på faste medier (5,6). Ved å anrike mediene med vekstfaktorer kan dyrkningstiden for positive prøver ytterligere reduseres. Automatisert dyrkning i flytende medier gir et raskt svar med høy sensitivitet (7-9), også i ekstrapulmonale prøver (10), og er derfor nå alment utbredt (1, 4). Subkultur fra flytende medier med vekst til faste medier er alltid nødvendig. Vekstkravene hos mykobakterier inkludert noen stammer av *M. tuberculosis* er slik at vekst og primær isolering på enkle, kjemisk-definerte medier ikke alltid er mulig uten tilsetning av serum, bovint serum albumin (BSA) eller andre tilsetninger. Alle prøver i flytende medium må dyrkes i minst 6 uker før de kan beskrives som negative, selv om de fleste positive funn gjøres i løpet av de 4 første ukene, også i lav-insidensland (6).

**1.2 Faste medier.** En fordel er at blandingskulturer lettere kan observeres på faste medier.

**Egg-holdige medier.** Løwenstein-Jensens (LJ) medium er det klassiske faste eggholdige mediet som brukes til dyrking av mykobakterier. LJ inneholder også glyserol (LJ-G), aminosyren asparagin og malakitt-grønt som er en hemmer av andre organismer enn mykobakterier.

LJ tilberedes lokalt eller kommersielt i skrå-rør (Fig. 1).

**Agar-baserte medier.** Det vanligste agarbaserte faste mediet er Middlebrook 7H10. På utvalgte prøver (se Tekstboks 2) utføres parallell dyrkning på flytende og fast medium (LJ-G eller 7H10/7H11) for å sikre vekst av alle mykobakterie-arter. Agarbaserte medier er mindre utsatt for kontaminasjon enn LJ-rør. Middlebrook 7H10 og 7H11-skåler lages vanligvis lokalt, med tilsetning av Middlebrook oleinsyre-albumin-dextrose-catalase (OADC). Siden de er gjennomsiktede, vil *M. tuberculosis* mikro-kolonier med typisk cord-dannelse være lett synlige i mikroskopet og antallet kan telles så tidlig som etter en ukes inkubering. Dessuten er koloni-morfologien tydeligere på agar-plate enn på egg-holdige skrå-rør, noe som hjelper til i identifikasjonen av mykobakterier. Middlebrook 7H11-mediet er bedre enn 7H10 fordi det inneholder 0.1% kasein-hydrolysat, en substans som fremmer isolering av isoniazid-resistente mykobakterier. Dessuten er 7H11 også bedre for å dyrke MDR *M. tuberculosis*-stammer idet disse ikke alltid vokser på 7H10 agar-skåler. Nye studier viser at det faste mediet som gir høyest følsomhet og best resultat er Middlebrook 7H11-mediet (11). En ulempe med faste Middlebrook-medier er imidlertid at overflaten kan tørke ut raskere enn egg-baserte medier.

CO<sub>2</sub> fremmer vekst ved primær isolering av mykobakterier og 5-10% CO<sub>2</sub> er anbefalt ved inkubering av Middlebrook og LJ, sist nevnte kun for de første 7-10 dagene.

**Kvalitetstesting.** Kvalitetstesting av medier mhp sterilitet, vekst og selektivitet utføres med følgende stammer som positive kontroller: *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177), *M. kansasii* ATCC 12478, *M. scrofulaceum* ATCC 19981, *M. intracellulare* ATCC 13950 og *M. fortuitum* ATCC 2841.

## 2. Dyrkning av mykobakterier fra pasientprøver

Rutinemessig sås det ut 2-3 rør pr. prøve. Inokulering på flytende medier må utføres med den største nøyaktighet under strenge sterile forhold for å unngå forurensning. Flytende medier er mer utsatt for kontaminasjon enn faste medier og tilsettes derfor PANTA for å

drepe mulige kontaminanter. Hvert MGIT rør inokuleres med 0.5 ml prøvemateriale. Prøven må deponeres under overflaten av mediet, mens røret holdes i en 45° vinkel. Røret settes så vertikalt, med inokulatet under væskeoverflaten. LJ-rør inokuleres med 0.2 ml prøvemateriale. For lite inokulat er en vanlig årsak til falskt negative dyrknings svar. I den øvre delen av skrå-røret er mediet tynt og tørkes lett ut. Dersom mykobakterier bare sås ut på denne øvre delen, kan det være at de ikke vokser, noe som kan føre til falskt negativt dyrkningsresultat.

Prøvene inkuberes ved 35–37 °C, og prøver fra hud og sår inkuberes i tillegg ved lavere temperatur (15–32 °C), idet enkelte mykobakteriearter som kan gi infeksjonssykdom i disse lokalisasjonene har et lavere temperatur-optimum.

Minimum 6 ukers inkubasjon i flytende medium er nødvendig for at en prøve kan rapporteres som negative, mens faste medier inkuberes i 8 uker (12 uker for utvalgte prøver) før de kan beskrives som negative (5). Flytende medier har den fordel over faste medier at vekst kommer raskere: gjennomsnittlig 7–14 dager i Middlebrook 7H9 flytende medium, sammenlignet med 18–28 dager i Middlebrook 7H11 agar, eller 21–42 dager i LJ-medium (1, 9-11). På fast medium vil *M. tuberculosis* danne synlige kolonier etter 16–30 dager, avhengig av inokulert bakteriemengde. Dersom prøven inneholder veldig få mykobakterier, kan det ta 3-8 uker før LJ-G-kulturer blir positive. Til tross for forbedringer i mediene for flytende kultur (7,8), er det fortsatt studier som viser at faste medier gir noe bedre resultat i form av bedre følsomhet (12,13). Automatisert dyrkning i flytende medier gir et raskere svar enn dyrking på faste medier, og er i mange studier mer sensitiv, også i ekstrapulmonale prøver (7-10), og er derfor nå alment utbredt (1).

Prøvemateriale som dyrkes på både flytende og faste medier, dvs MGIT og LJ-G eller 7H10/7H11 uten forbehandling er benmarg, blodkulturer, biopsier og andre viktige, sterile materialer (Tekstboks 4). Andre prøver som dyrkes på både flytende medium og LJ-G eller 7H10, er luftveisprøver fra pasienter med cystisk fibrose. Formålet med utvidet bruk av LJ-G er økt påvisning av noen *M. tuberculosis*-stammer og non-tuberkuløse mykobakterier (NTM) som for eksempel *M. ulcerans*. LJ-G fremmer vekst av *M. tuberculosis*, mens Løwenstein-Jensen medium med pyruvat (LJ-P) fremmer vekst av *M. bovis*. I områder der *M. bovis* blir isolert, anbefales det derfor å inkludere et LJ-P-rør i tillegg til LJ-G. *M. ulcerans* og *M. bovis* er imidlertid ikke store kliniske utfordringer i norske laboratorier. *M. bovis* vokser erfaringsmessig godt i MGIT-rør. Både WHO (4) og CDC (2) anbefaler at kliniske mykobakterielaboratorier dyrker alle kliniske prøver til mykobakterie-dyrkning i flytende medium (8-10), mens noen laboratorier inkludert ECDC anbefaler fortsatt bruk av både flytende og fast medium for alle prøver (3, 12, 13).

Inokulerte faste medier inspireres 2-3 ganger i uken. Kulturer på faste medier undersøkes første gang 48 timer etter utsæd for å:

- sjekke absorpsjon av flytende prøvemateriale/inokulat
- skru igjen korken for å hindre uttørring av mediet
- påvise tidlige kontaminanter

Deretter inspireres kulturene 2-3 ganger ukentlig:

- Etter 7 dager: påvisning av hurtigvoksende mykobakterier.
- Etter tre-til-fire-uker: sjekk for å se etter positive vekst av *M. tuberculosis* samt andre langsomtvoksende mykobakterier.
- Slutt-sjekk (etter 6-8 uker) for å påvise særlig langsomtvoksende mykobakterier, inkludert *M. tuberculosis*, før rapportering av negativt dyrkningsresultat.

### 3. Undersøkelse av positive kulturer

Alle prøver som er dyrket på BACTEC MGIT 960 og flagget ut som positive, dyrkes videre på fast medium, inkludert de som er mikroskopi negative (Auramin 2x). Identifikasjon av *M. tuberculosis* utføres ved bruk av MPT64 ID test, hybridisering, sekvensering eller PCR. Resistensbestemmelse utføres i flytende medium (14) eller på LJ-G (15). Alle mykobakteriekulturer sendes referanse-laboratoriet Ved Folkehelseinstituttet.

Identifisering av mykobakteriesuspekterte kolonier gjøres ved bedømmelse av kolonimorfologi, veksthastighet, fotoreaktivitet, kromatografi samt forskjellige biokjemiske tester som gjør det mulig å skille de enkelte mykobakteriearter fra hverandre. Ved oppvekst av mykobakterier i laboratoriet er en rask identifikasjon viktig for å skille mellom *M. tuberculosis*-komplekset og andre mykobakteriearter. Først utføres mikroskopi og/eller PCR av kulturen for å bekrefte (eller avkrefte) at veksten utgjøres av syrefaste stavbakterier. En rask biokjemisk identifikasjon av stammer i *M. tuberculosis*-komplekset utføres ved påvisning av et spesifikt protein, MPT64 antigen, som tuberkulose-bakteriene utskiller under vekst. Ytterligere identifikasjon utføres ved bruk av genteknologiske metoder. Videre identifikasjon av syrefaste staver utføres ved noen få større laboratorier i Norge. Genteknologiske metoder, som hybridisering og amplifikasjonsmetoder (PCR) benyttes til hurtig identifikasjon av mykobakterie-isolater, gjerne direkte fra flytende medier.

Ut fra makro- (ved vekst på fast medium) og mikroskopisk utseende kan man ofte med relativt stor sikkerhet avgjøre om stammen tilhører *M. tuberculosis*-komplekset eller en annen mykobakterie-art. Spesielt i kultur har artene i *M. tuberculosis*-komplekset en tendens til parallell sammenklumping, noe som kalles "cord factor" og kan observeres mikroskopisk.

Hvis man ser bort fra vaksinerelaterte infeksjoner med *M. bovis* BCG, vil 99.9 % av påviste stammer i *M. tuberculosis*-komplekset være *M. tuberculosis* her i Norge. Andre mer sjeldent forekommende NTM-arter identifiseres med genteknologiske og biokjemiske metoder, mikroskopi og/eller PCR og dyrkning. Mikroskopi utføres primært med auramin-farging og fluorescensmikroskopi og verifiseres ved behov med Ziehl-Neelsen-farging.

### 4. Kontaminasjon

De ulike typene av kontaminanter som bør vurderes er: NTM, andre bakterier, muggsopp og gjærsopp. En ulempe med egg-baserte medier er at når kontaminasjon forekommer, dekker den ofte hele overflaten, slik at kulturen kan gå tapt. Dekontaminasjon av kliniske prøver fra områder med normalflora med laurylsulfat-dekontaminasjon er imidlertid uforenlig med både MGIT og PCR (5).

Evaluering av kontaminasjonsrate bør utføres hver 3.-6. måned for å sikre god nok kvalitet. En kontaminasjonsrate på 3–5% anses som en god balanse mellom behovet for å drepe kontaminanter og behovet for å beholde de viktigste tuberkel-bakteriene i live i prøven. En kontaminasjonsrate på 0–1% indikerer for sterk dekontamineringsprosess.

### 5. Resistensbestemmelse

Resistensbestemmelse med hensyn til følsomhet overfor antituberkulose-medikamenter utføres ved dyrkning. Bakterien dyrkes da i flytende Middlebrook 7H9 medium (14) eller på faste LJ medier (15) med forskjellige medikamentkonsentrasjoner, den såkalte modifiserte proporsjonsmetoden. Medikamenter som testes er førstelinjemedikamentene rifampicin (høy/lav), isoniazid (høy/lav), pyrazinamid, ethambutol og streptomycin. Resultatet ved bruk av flytende medium foreligger da i løpet av 1 uke og 4 uker for LJ. Testing av resistens mot andrelinjemedikamenter utføres ved Folkehelseinstituttet.

I tillegg påvises punktmutasjoner som gir rifampicin- og/eller isoniazid-resistens ved nukleinsyre-påvisning, vanligvis realtids-PCR, ved mange laboratorier i Norge.

#### 6. Problemstilling: Dyrkning på flytende versus faste medier

Det er noe ulik praksis ved norske mykobakterielaboratorier vedrørende valg av dyrkningsmedier. Alle primære pasientprøver anbefales dyrket på flytende medium (1,2). Spørsmålet er om bredt utvalgte pasientprøver eller alle kliniske prøver skal dyrkes parallelt på både flytende og faste medier. Mange referanse-laboratorier anbefaler å dyrke kliniske prøver parallelt i flytende og faste medier fordi ikke alle mykobakterie-stammer vokser i flytende medium. Ved Avdeling for mikrobiologi ved OUS-RH utføres siden 1999 all dyrkning i flytende Middlebrook 7H9 medium (p.t. BACTEC MGIT 960, tidligere BACTEC 460) ifølge internasjonale retningslinjer fra WHO (1) og CDC (2), mens bredt utvalgte prøver også dyrkes på faste medier (Middlebrook 7H10 eller LJ-G) og ved ulike temperaturer. Begrunnelsen for dette medie-valget er at resultatet ved BACTEC MGIT 960 i mange studier oppgis å være bedre enn for LJ med hensyn på tid-til-deteksjon og følsomhet, og at gevinsten ved dobbelt-dyrkning utover det som allerede utføres, er minimal. Det er også et meget kostnadseffektivt valg. Ved Avdeling for mikrobiologi ved OUS-UUS utføres fortsatt dyrkning av alle kliniske prøver på både flytende og fast medium, for å sikre helt optimal sensitivitet ved dyrkning. Dette poenget vil bli diskutert på Strategimøtet 26. oktober 2016.

#### Referanser

1. WHO (2009) Use of liquid TB culture and Drug Susceptibility Testing (DST) in low and medium income settings. In. Geneva: World Health Organization. <http://www.who.int/tb/dots/laboratory/policy/en/index3.html>.
2. CDC guidelines chapter 4: Diagnosis of Tuberculosis Disease <http://www.cdc.gov/tb/education/corecurr/pdf/chapter4.pdf>.
3. ECDC TECHNICAL DOCUMENT: Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union, Stockholm 2016, ISBN 978-92-9193-739-4.
4. World Health Organization (2013) Systematic screening for active tuberculosis: principles and recommendations. <http://www.who.int/tb/tbscreening/en/>.
5. Pfyffer GE. Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition ASM. Chapter 30, pp 536-569, 2015.
6. Pfyffer GE, Wittwer F. Incubation time of mycobacterial cultures: how long is long enough to issue a final negative report to the clinician? J Clin Microbiol 50(12):4188-9, 2012.
7. Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti MT, Gesu G, Nista D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: A multicenter study. J Clin Microbiol 37(11):3578-82, 1999.
8. Moreira Ada S, Huf G, Vieira MA, Costa PA, Aguiar F, Marsico AG, Fonseca Lde S, Ricks M, Oliveira MM, Detjen A, Fujiwara PI, Squire SB, Kritski AL. Liquid vs Solid Culture Medium to Evaluate Proportion and Time to Change in Management of Suspects of Tuberculosis-A Pragmatic Randomized Trial in Secondary and Tertiary Health Care Units in Brazil. PLoS One 10(6):e0127588, 2015.
9. Pardini M, Varaine F, Bonnet M, Orefici G, Oggioni MR; LONG-DRUG Study Group, Fattorini L. Usefulness of the BACTEC MGIT 960 system for isolation of



- mycobacterium tuberculosis from sputa subjected to long-term storage. J Clin Microbiol 45(2):575-6, 2007.
10. Hillemann D, Richter E, Rüscher-Gerdes S. Use of the BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 automated system for recovery of Mycobacteria from 9,558 extrapulmonary specimens, including urine samples. J Clin Microbiol 44(11):4014-7, 2006.
  11. Joloba ML, Johnson JL, Feng PJ, Bozeman L, Goldberg SV, Morgan K, Gitta P, Boom HW, Heilig CM, Mayanja-Kizza H, Eisenach KD. What is the most reliable solid culture medium for tuberculosis treatment trials? Tuberculosis 94(3):311-6, 2014.
  12. Simner PJ, Doerr KA, Steinmetz LK, Wengenack NL. Mycobacterium and Aerobic actinomycetes Culture: Are Two Medium Types and Extended Incubation Times Necessary? J Clin Microbiol 54(4):1089-93, 2016.
  13. Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, Morgan MA, Novak SM, Rusch-Gerdes S, Acio M, Dunbar DF, Holmes TM, Rexer CH, Savthyakumar C, Vannier AM. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol 37(3):748-52, 1999.
  14. Bemer P, Palicova F, Rüscher-Gerdes S, Drugeon HB, Pfyffer GE. Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 40(1):150-4, 2002.
  15. Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler HT, Meissner G, Mitchison DA, Sula A L. Mycobacteria: Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull World Health Organ 9:565-78, 1963.

### **Tekstboks 1: Dyrkningsmedier for mykobakterier**

#### **Flytende medier**

##### **Middlebrook 7H9 broth**

Dubos' medium

Proskauer and Beck's medium

Sula's medium

Sauton's medium

#### **Faste medier**

**Egg-baserte – Löwenstein-Jensen medium, Petragnani medium & Dorset medium**

Middlebrook 7H10/7H11 agar

Blood-baserte – Tarshis medium

Serum-baserte – Loeffler medium

Potato-baserte – Pawlowsky medium

### **Tekstboks 2: De mest vanlig brukte ikke-selektive mediene:**

- Flytende medier: Middlebrook 7H9 broth

- Egg-based medier: Löwenstein-Jensen (LJ) medium og Ogawa medium

- Agar-baserte medier: Middlebrook 7H10 og Middlebrook 7H11

**Tekstboks 3: De vanligste kommersielt tilgjengelige automatiserte systemene for hurtig påvisning av mykobakterier i flytende medium:**

- BACTEC MGIT 960 system (BD [Becton, Dickinson and Company] DiagnosticSystems)
- ESP Culture System II (Trek Diagnostic Systems)
- MB/BacT (bioMérieux)

**Tekstboks 4: Et bredt utvalg av prøver dyrkes parallelt på både flytende og faste medier ved Mykobakterie-laboratoriet på OUS-RH**

Benmarg

Blodkulturer

Spinalvæske

Hjernebiopsi

Andre viktige, sterile materialer

Dyrkes i tillegg på Løwenstein-Jensen med glycerol (fremmer vekst av *M. ulcerans*):  
luftveisprøver fra CF-pasienter

Dyrkes i tillegg på Løwenstein-Jensen med pyruvat: når mistanke om *M. bovis*

## 2.6 Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) with MPT64-antigen based rapid tests (MPT64 ICTs)

Harleen Grewal ([Harleen.Grewal@uib.no](mailto:Harleen.Grewal@uib.no)) and Ba Ngoc Vu, Mikrobiologisk avdeling, Haukeland universitetssjukehus, Bergen.

The *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) comprises closely related species such as *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, and *M. canetti* which cause tuberculosis (TB) in humans and animals (Wayne and Kubica; 1986). Nontuberculous mycobacteria (NTM) are a major cause of opportunistic infections mainly in immunocompromised individuals. The ability to identify MTBC isolates and differentiate them from NTM is important for the selection of antimicrobial therapy and appropriate patient management.

Definite diagnosis of TB can be made by identifying *M. tuberculosis* complex organisms from a clinical sample after growth in solid or liquid media. MPT64 is a 24 kDa protein secreted by MTBC during bacterial growth. Since MTBC strains (with the exception of some sub-strains of *M. bovis* BCG) but not non-tuberculous mycobacteria specifically and predominantly secrete the MPB64 protein (mycobacterial protein fraction from BCG of Rm 0.64), this can be used to discriminate between *M. tuberculosis* complex and non-tuberculous mycobacteria.

Rapid MPT64-based immunochromatographic tests (MPT64 ICTs) have been developed to detect the MTBC in culture. MPT64-based ICTs are relatively easy to perform and only require the type of laboratory infrastructure that is needed for routine mycobacterial cultures. The turnaround time of this method is 15 min for liquid culture and 30 min for solid culture. Till date, 3 commercial MPT64-based ICT kits have been introduced for rapid identification of MTC, including Capilia TB assay (TAUNS, Numazu, Japan), SD Bioline Ag MPT64 rapid assay (Standard Diagnostics, Yongin, South Korean) and BD MGIT TBc ID test (Becton Dickinson, Sparks, USA) [Brent A. J. *et al*; 2011]. The principles of these commercial kits are identical.

A recent meta-analysis on the performance of commercial MPT64-based ICTs, that included 28 studies in the final analysis, concluded that MPT64-based ICTs are highly sensitive and specific for rapid identification of the *M. tuberculosis* complex. Pooled estimates were 97% (confidence interval [CI] 96–97%) for sensitivity and 98% (CI 98–99%) for specificity (Yin X *et al*; 2013). Meta-analysis of MPT64 ICT performance for identification of MTBC in liquid culture confirmed similar very high sensitivities and specificities for all three commercial MPT64 assays for which sufficient data were available. MPT64 ICTs are good alternatives to biochemical tests and molecular assays for identification of MTBC complex members. The main advantages of the test are the cost and rapidity. However, it has some disadvantages. The method (i) cannot be applied directly to clinical samples; (ii) does not allow the identification at species level and (iii) requires further confirmatory tests for identification at species level.

Further, there are reports that a few clinical MTBC isolates have been falsely identified as NTM because of mutations in the *mpt64* gene (Hirano K *et al*; 2004, Hillemann D *et al*; 2005). Discordant results have also been observed in highly contaminated samples or with a low

expression of the antigen in the medium. Presence of contamination can be evaluated by inoculation of the cultures into blood agar plates and Ziehl-Neelsen staining. Thus, a small minority of MTBC isolates are not detected by MPT64 assays due to deletion or mutation of the *mpt64* gene (absent from some *M. bovis* BCG strains) or too low MPT64 concentrations in early cultures or mixed cultures (Brent A. J. *et al*; 2011). The low cost and simplicity of MPT64 assays outweigh the small reduction in sensitivity in most settings.

Laboratories that only perform primary processing and mycobacterial culture can use a commercial MPT64-based ICT for example the BD TBc Antigen assay to provide rapid confirmation of the identification of the *Mycobacterium* spp. before sending the broth culture to the referral laboratory for confirmatory identification and drug susceptibility testing. The major advantages of using the MPT64-ICT are: (1) simplicity of test procedure, (2) rapid turnaround time, and (3) relatively inexpensive. When used in conjunction with the presence of serpentine cording in a Ziehl-Neelsen stained smear from culture, a preliminary identification of MTBC can be made with high confidence. This approach reduces the time to a presumptive confirmation of the diagnosis of TB.

#### References:

**Wayne, L. G., and G. P. Kubica.** 1986. The mycobacteria, p. 1435-1457. *In* P. H. A. Sneath and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.

**Yin X, Zheng L, Lin L, Hu Y, Zheng F, Hu Y, Wang Q.** Commercial MPT64-based tests for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex: a meta-analysis. *Journal of Infection*, Volume 67, Issue 5, November 2013, Pages 369–377

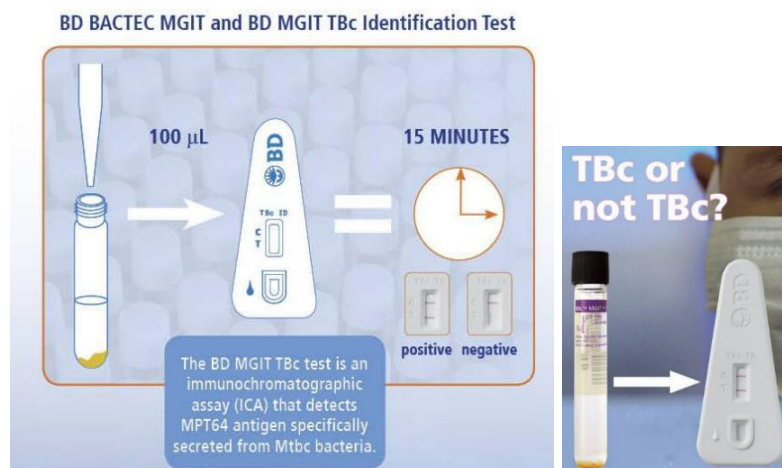
**A.J. Brent,** D. Mugo, R. Musyimi, A. Mutiso, S. Morpeth, M. Levin, *et al.*  
Performance of the MGIT TBc identification test and meta-analysis of MPT64 assays for identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in liquid culture  
*Journal of Clinical Microbiology*, 49 (2011), pp. 4343–4346

**K. Hirano,** A. Aono, M. Takahashi, C. Abe. Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of capilia TB-negative *Mycobacterium tuberculosis* isolates  
*Journal of Clinical Microbiology*, 42 (2004), pp. 390–392.

**D. Hillemann,** S. Rusch-Gerdes, E. Richter. Application of the capilia TB assay for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 9 (2005), pp. 1409–1411

**Vedlegg:****Metode (BD BACTEC): innført Mikrobiologisk avdeling (MIA) HUS23.03.2011**

TBc ID-testen er en kromatisk immunologisk analyse for kvalitativ påvisning av *Mycobacterium tuberculosis* komplekset (MTBC) i BD MGIT dyrkningsmedium hvor syrefaste staver er påvist. Dette produktet påviser MPT64, en mykobakteriell proteinfraksjon som utskilles fra MTBC under vekst. I testenheten bindes MPT64 antigen i prøven til konjugerte anti-MPT64-antistoffer. Antigen-konjugat komplekset migrerer over teststrimmelen til reaksjonsområdet og bindes til et annet konkret MPT-64 antistoff som er påført membranen. Dersom MPT64 antigen finnes i prøven, oppstår det en fargereaksjon av de merkede kolloidale gullpartikler, og det dannes en rød eller rosa strek.

**TBc BD MGIT identifikasjonstest; MIA, Haukeland Universitetssykehus**

Result	2012	2013	2014	2015	2016	Total
Inklusiv			1	2		3
Negativ	15	17	24	37	19	112
Positiv	15	13	14	15	14	71
Total	30	30	39	54	33	186

**Prøvemateriale**

BD MGIT dyrkningsmedium (7H9 buljong) hvor syrefaste staver er påvist.

**Prøveoppbevaring**

MGIT rør med vekst av syrefaste staver kan oppbevares ved 2-37 °C i opptil 10 dager før testing med TBc ID-enheten, eller om nødvendig oppbevares ved ±20 - +8 °C i opptil 2 måneder.

**Utstyr**

- Sikkerhetskabinett kl II
- Mikropipette med leveringskapasitet på 100µl
- Sterile pipettespisser
- Tidsmåler

## Reagenser

- BD MGIT TBc ID test; kit a 25 testenheter innpakket i foliepose.
- Testenhetene kan oppbevares ved 2 – 35 °C, må ikke fryses
- Enhetene må ha romtemperatur på testtidspunktet

## Forsiktighetsregler og feilkilder

- Enheten må ikke brukes etter utløpsdato.
- Hvis andre bakterier enn syrefaste staver dominerer i prøven, kan testen bli falsk positiv. Bruk derfor kun testen hvis syrefaste staver dominerer i prøven.
- Brukte testenheter kan inneholde levedyktige mykobakterier og skal håndteres etter laboratoriets arbeidsrutiner.
- Enkelte understammer av *M. bovis* BCG produserer ingen MPT64-antigener og vil derfor medføre et negativt testresultat.
- Noen protein-A produserende stammer av bakterier kan føre til falskt positivt svar (f. eks. *S. aureus*).
- Et negativt resultat utelukker ikke infeksjon med MTbc. Testen bør ikke brukes alene til påvisning av MTbc-infeksjoner, men skal brukes sammen med opplysninger og kliniske vurderinger av pasienten og andre diagnostiske prosedyrer.

## Utførelse

*Alt arbeid med mykobakterier skal utføres i sikkerhetskabinett*

- Ta testenheten ut av folieposen umiddelbart før testing.
- Merk en enhet for hver prøve som skal testes.
- Bland prøven (MGIT røret med påviste syrefaste staver) grundig ved å snu den opp-ned eller vortex.
- Prøven skal ikke sentrifugeres.
- Overfør 100µl kultur til prøvebrønnen ved dråpemerket, se Fig. 1.
- Sett tidsmåleren på 15 min.
- Les av etter 15 min og noter resultatet.
- Ikke tolk testen etter 60 min.

## Kvalitetskontroller

Positiv kontroll: MGIT-rør med vekst av ATCC 25177 H37Rv.

## Tolkning av resultater

**Positiv test for MTBC:** En rosa til rød strek vises ved Test "T"-posisjonen og Kontroll "C" posisjonen i avlesningsvinduet. Dette viser at det ble påvist MPT64 antigen i prøven. C- og T-strekene kan være mer eller mindre tydelige. Bakgrunnsområdet bør være hvitt til lys rosa.

**Negativ test for MTBC:** Ingen rosa til rød strek vises ved Test "T"-posisjon i avlesningsvinduet. Dette viser at det ikke ble påvist MPT64 antigen i prøven. En strek ved Kontroll "C" posisjon i avlesningsvinduet indikerer at testprosedyren er riktig utført. Bakgrunnsområdet bør være hvitt til lys rosa.

**Ugyldig test:** Ingen rosa eller rød strek er synlig ved Kontroll "C" posisjon i avlesningsvinduet. Dersom bakgrunnsområdets farge ødelegger for tolkningen av testen. Ugyldige tester må testes på nytt.

## 2.7 Identifisering av mykobakterier ved hjelp av MALDI-TOF massespektrometri

Av André Ingebretsen, Avd. for mikrobiologi og Avd. for smittevern, Oslo universitetssykehus

De senere årene har identifikasjon av mikroorganismer ved hjelp av massespektrometri erstattet mange av de eldre, fenotypiske identifikasjonstestene. Noen av fordelene ved å identifisere bakterier ved bruk av MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) er metodens kostnad, hurtighet, sensitivitet og reproduserbarhet. Som for alle automatiske og semiautomatiske identifikasjonssystemer er man helt avhengig av kvaliteten på identifikasjonssystemets spekterdatabase for å få gode identifikasjoner. Åpne spekterdatabaser finnes det flere av, men som oftest brukes spekterdatabaser som er knyttet til leverandøren av selve MS-instrumentet. Databasene varierer i størrelse og oppbygging avhengig av leverandør.

I Norden er det pr. dags dato lite utbredt å identifisere mykobakterier rutinemessig ved å bruke MALDI-TOF massespektrometri. Dette kan skyldes flere faktorer, men trolig har omfattende proteinekstraksjonsmetoder noe av skylden.

Mangel på en felles standard identifikasjonsprosedyre for mykobakterier har resultert i mange varianter av metoder (1-5), men de har alle tre trinn felles: (A) Inaktivering, (B) cellelysering og (C) proteinekstraksjon. Det er viktig å få validert inaktiveringmetode for mykobakteriene før man flytter de ut fra P3-laboratoriet (6). Inaktiveringen består av enten varmeinaktivering, kjemisk inaktivering eller mekanisk inaktivering. For å oppnå best mulig identifikasjon er det avgjørende at man bruker tilnærmet lik ekstraksjonsmetode som er brukt for å bygge opp spekterbiblioteket. Bruker Daltonics har sin utviklet sin MycoEX metode som er grunnlaget for deres spekterbibliotek og Biomerieux har utviklet sin BMX metode som er grunnlaget for deres bibliotek.

Det er rapportert dårligere identifikasjonsresultater direkte fra flytende buljong (MGIT) enn fra faste medier (Løwenstein-Jensen, 7H9, 7H10, 7H11) (4,7-9). Variasjon av scoreverdi mellom faste medier er liten, men økende alder på kulturen ser ut til å gi dårligere scoreverdi (8,10). Produsenten av databasen angir terskelverdi for hva som er godkjent scoreverdi for identifikasjon til artsnivå. For mykobakterier er det rapportert gode identifikasjoner til artsnivå med scoreverdi  $\geq 1.6$  for Bruker sitt system(11).

Det vil være en stor tidsmessig fordel å kunne identifisere mykobakterier direkte fra positive MGIT/BacTAlert MB 3D rør uten å gå via kultur på faste media. Mindre biomasse, forstyrrende proteiner i prøvene og blandingskulturer kan være grunner til at man oppnår dårligere resultat med flytende medier.

Uavhengig av identifikasjonsprosedyre så har det vist seg vanskelig å identifisere og differensiere artene i *M. tuberculosis*-komplekset. Det samme gjelder arter som står svært nær hverandre fylogenetisk. Dette gjelder *M. chimaera/intracellulare*, *M. mucogenicum/phocaicum*, *M. marinum*/*M. shotsii*, *M. kansasii*/*M. gastri*. Subarter av *M. abscessus* kan differensieres, men å differensiere *M. abscessus* ssp. *abscessus* og *M. abscessus* ssp. *massiliense* har vist seg arbeidskrevende. Identifikasjon av arter som står

hverandre nær og har klinisk betydning bør bekreftes med sekvensering av *rpoB*, *hsp65* eller *gyrB*.

#### Anbefaling:

**Identifikasjon av mykobakterier ved hjelp av MALDI TOF MS bør innføres på laboratorier der dette er aktuelt d.v.s. laboratorier som dyrker mykobakterier og har et MALDI TOF MS system. Valg av identifikasjonsprosedyre inkludert inaktivering, proteinekstraksjon og tolkning av scoreverdier bør følge retningslinjer fra produsent av spekterbibliotek. Det bør primært utføres identifikasjon fra faste media, men på sikt utvikles en universal standardprosedyre for identifikasjon fra flytende media.**

#### Referanser

1. Zingue D, Flaudrops C, Drancourt M. Direct matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria from colonies. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2016 Aug 23. PubMed PMID: 27549109. Epub 2016/08/24. Eng.
2. Girard V, Mailler S, Welker M, Arzac M, Celliere B, Cotte-Pattat PJ, et al. Identification of mycobacterium spp. and nocardia spp. from solid and liquid cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2016 Aug 2. PubMed PMID: 27567285. Epub 2016/08/28. Eng.
3. Hettick JM, Kashon ML, Simpson JP, Siegel PD, Mazurek GH, Weissman DN. Proteomic Profiling of Intact Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2004 2004/10/01;76(19):5769-76.
4. Lotz A, Ferroni A, Beretti J-L, Dauphin B, Carbonnelle E, Guet-Revillet H, et al. Rapid Identification of Mycobacterial Whole Cells in Solid and Liquid Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010 December 1, 2010;48(12):4481-6.
5. Rodriguez-Sanchez B, Ruiz-Serrano MJ, Marin M, Lopez Roa P, Rodriguez-Creixems M, Bouza E. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nontuberculous Mycobacteria from Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2015 Aug;53(8):2737-40. PubMed PMID: 26063855. Pubmed Central PMCID: PMC4508414. Epub 2015/06/13. eng.
6. Park JS, Choi SH, Hwang SM, Hong YJ, Kim TS, Park KU, et al. The impact of protein extraction protocols on the performance of currently available MALDI-TOF mass spectrometry for identification of mycobacterial clinical isolates cultured in liquid media. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2016 Sep 1;460:190-5. PubMed PMID: 27380997. Epub 2016/07/07. eng.
7. van Eck K, Faro D, Wattenberg M, de Jong A, Kuipers S, van Ingen J. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Fails To Identify



Nontuberculous Mycobacteria from Primary Cultures of Respiratory Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016 July 1, 2016;54(7):1915-7.

8. Quinlan P, Phelan E, Doyle M. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) for the identification of mycobacteria from MBBacT ALERT 3D liquid cultures and Lowenstein-Jensen (LJ) solid cultures. *Journal of clinical pathology*. 2015 Mar;68(3):229-35. PubMed PMID: 25540267. Epub 2014/12/30. eng.
9. Totty H, Miller E, Moreno E, Dunne WM, Deol P. Comparison of mechanical disruption techniques for the rapid inactivation of Mycobacterium and Nocardia species before identification using MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016 August 10, 2016.
10. Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols. *J Clin Microbiol*. 2014 Jan;52(1):130-8. PubMed PMID: 24172150. Pubmed Central PMCID: PMC3911429. Epub 2013/11/01. eng.
11. Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM. Identification of Mycobacteria in Solid-Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011 May 1, 2011;49(5):1790-4.

## 2.8 Identifikasjon av mykobakterier med molekylære metoder

Mona Holberg-Petersen ([uxmolb@ous-hf.no](mailto:uxmolb@ous-hf.no)), Avdeling for mikrobiologi, OUS.

Genus *Mycobacterium* består av *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. leprae* og en gruppe av alle andre mykobakterie-arter som kalles nontuberculous mycobacteria (NTM). Identifikasjon av mykobakterie-isolater til arts- eller kompleksnivå er viktig for å skille patogene mykobakterier fra de som ikke gir sykdom, gi optimal behandling og hindre smittespredning. Genetisk identifikasjon er i de fleste tilfeller raskere og mer presis enn fenotypisk. Enkelte arter kan bare identifiseres med genetiske metoder og i løpet av de siste 25 årene er en rekke nye mykobakteriearter identifisert. Det er nå beskrevet 175 forskjellige arter og 13 subspecies (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>). Identifikasjon med molekylærbiologiske metoder kan utføres direkte fra flytende kultur. Det er imidlertid anbefalt at resultatene bekreftes med fenotypiske trekk som veksthastighet, kolonimorfologi, og pigmentering.

Flere målområder er egnet til gen-sekvensanalyse for identifikasjon av mykobakterier, men det er forskjell på hvor godt de skiller de enkelte artene. De mest brukte er genene som koder for ribosomalt RNA (16S rDNA), 65-kDa heat shock protein (*hsp65*), RNA polymerase  $\beta$ -subenheten (*rpoB*), 23S rDNA, 16S-23S Internal Transcribed Spacer (ITS), og DNA gyrase B (*gyrB*). Krav til mål-genene er at de må være tilstede i alle mykobakterier og må inneholde konserverte og variable områder. De konserverte områdene er mål for PCR-primere (broad-range PCR) og de variable må være arts- eller kompleks spesifikke, men ikke variere innen arten.

### Genotypisk identifikasjon av artene i *M. tuberculosis*-komplekset (MTBC)

Artene i MTBC (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* og *M. pinnipedii*) er genetisk veldig like. De kan ikke skilles ved analyse av de vanligst brukte mål-genene (16S rDNA, 23S rDNA, ITS, og *rpoB*), men det er påvist enkelt nukleotid polymorfismer i *gyrB* som er spesifikke for noen av artene i MTBC og tilstedeværelse eller delesjon av konserverte RD (regions of difference) er også vist å kunne skille enkelte av artene.

Genotype MTBC, en kommersielt tilgjengelig hybridiseringstest fra Hain, benytter analyse av flere mål-gen (MTBC-spesifikt 23S rRNA gen-fragment, *gyrB* DNA sekvens polymorfismer, og tilstedeværelse eller delesjon av RD1) for å identifisere artene i MTBC (1). *M. tuberculosis* og *M. canettii* og *M. africanum* og *M. pinnipedii* kan imidlertid ikke skilles med denne testen. En ny test Speed-Oligo MTBC fra Vircell blir snart tilgjengelig (2).

### Genotypisk påvisning av *M. leprae*

*M. leprae* lar seg ikke dyrke, men kan påvises med PCR. GenoType (Hain, Tyskland) har en test LepreaDR til samtidig påvisning av *M. leprae* og resistens mot rifampicin, ofloxacin og dapsoner.

### Genotypisk identifikasjon av NTM

NTM er primært miljøbakterier, men flere av artene er assosiert med sykdom hos mennesker. Analyse av mål-gen med sekvensering, hybridisering, restriksjonsfragment lengde polymorfisme (RFLP), pyrosekvensering, next generation sequencing (NGS) og microarray er molekylærbiologiske metoder som er beskrevet for identifikasjon av NTM til arts- eller kompleksnivå. Genteknologiske undersøkelser basert på hybridisering med spesifikke DNA-prober eller sekvensering er mest brukt. De vanligste mykobakterie-artene

kan identifiseres med en hybridiseringstest. Sekvensering er noe mer arbeidskrevende og benyttes vanligvis til identifikasjon av stammer som ikke kan identifiseres ved hjelp av en hybridiseringstest.

### Hybridiseringstester

De fleste hybridiseringstestene bruker PCR med generelle primere som vil formere DNA fra alle mykobakteriearter og påvisning med prober som er arts- eller kompleks spesifikk. Det er kommersielt tilgjengelige tester, f.eks. GenoType, INNO-LiPA (Innogenetics, Belgia), AccuProbe (Gen-Probe, San Diego) og Speed-Oligo (Vircell). Det er forskjell mhp hvilket mål-gen testen bruker, hvor god den er til å skille mellom enkelte arter, og hvor mange arter den kan påvise i én og samme reaksjon. Det er viktig å være klar over at feilidentifikasjon er beskrevet for alle hybridiseringstestene (3-5).

Det er to GenoType tester, begge har 23S rDNA som mål-gen. Mycobacterium CM (Common Mycobacteria) kan påvise *Mycobacterium* genus, *M. tuberculosis* complex og 14 av de vanligste mykobakterieartene (*M. avium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. xenopi*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. fortuitum*) i én reaksjon. Mycobacterium AS (Additional Species) påviser 16 andre mykobakteriearter (*M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum*, *M. shimoidei*, *M. phlei*, og *M. szulgai*/*M. intermedium*).

GenoType har også en test NTM-DR som kan skille artene *M. avium*, *M. intracellulare* og *M. chimaera* i *M. avium* kompleks og *M. chelonae* og de forskjellige *M. abscessus* subspecies (*M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, and *M. abscessus* subsp. *massiliense*). Testen kan også påvise antibiotikaresistens mot disse artene.

INNO-LiPA Mycobacteria v2 bruker 16S-23S Internal Transcribed Spacer (ITS) som mål-gen og kan påvise *Mycobacterium* genus og 16 mykobakterie-arter eller kompleks (*M. tuberculosis* complex, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. celatum*, MAIS (*M. avium*/*intracellulare*/*scrofulaceum*), *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. chelonae* complex, *M. fortuitum* complex, og *M. smegmatis*) i én reaksjon.

I motsetning til Genotype kan ikke INNO-LiPA skille mellom *M. abscessus* og *M. chelonae*, og *M. marinum* og *M. ulcerans*.

AccuProbe bruker 16S rDNA som mål-gen. Det er seks kit tilgjengelige; *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae* og *M. kansasii*. Én art eller kompleks identifiseres i hver reaksjon.

Speed-oligo Mycobacteria bruker 16S rDNA til påvisning av *Mycobacterium* genus og 16S-23S Internal Transcribed Spacer (ITS) til å differensiere mellom *M. tuberculosis* complex, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. xenopi*, MAIS (*M. avium*/*intracellulare*/*scrofulaceum*), *M. malmoense*, *M. gordonae*, *M. interjectum*, *M. peregrinum*, *M. fortuitum* complex, *M. chelonae*/*abscessus* complex, og *M. kansasii*.

## Sekvensering

### Målgen

Med sekvensering kan i prinsippet alle mykobakteriearter identifiseres i én og samme reaksjon. Områder i 16S rDNA, *hsp65* og *rpoB* har vist seg egnet for identifikasjon av mykobakterier (6-10). Analyse av en kombinasjon av flere mål-gen er beskrevet å gi en mer presis identifikasjon, spesielt for nye arter.

Sekvensering av genet som koder for 16S rRNA regnes som referansemetoden og 16S rDNA sekvenser er publisert for alle beskrevne mykobakteriearter. Genet er ca 1500 bp, men for identifikasjon av de fleste mykobakterie-arter eller kompleks vil det være tilstrekkelig å analysere de 500 første basene som inneholder hypervariabelt område A og B. Det er også fra dette området det er flest mykobakteriesekvenser i databasene. Noen arter har imidlertid intraspecies 16S rDNA sekvensvariasjon (*M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. celatum*, *M. gordonae*, og *M. lentiflavum*), mens andre har lik 16S rRNA gen-sekvens og kan ikke skilles ved analyse av dette målområdet. Dette gjelder f.eks. artene i *M. tuberculosis* complex, *M. marinum* og *M. ulcerans*, og *M. kansasii* og *M. gastri*, *M. avium* subsp. *M. chelonae*-*M. abscessus* gruppen og *M. fortuitum* gruppen. For identifikasjon av disse artene må man analysere alternative gen som *gyrB* (*M. tuberculosis* complex), *hsp65* eller *rpoB*.

*hsp65* var et av de første mål-gen som ble brukt til identifikasjon av mykobakteriearter, og et hypervariabelt område på 400 bp har vist seg spesielt egnet. Det er mindre konservert enn 16S rDNA og egner seg derfor bedre til å skille enkelte nært beslektede arter som *M. marinum* og *M. ulcerans*, *M. kansasii* og *M. gastri*, og *M. chelonae* og *M. abscessus*. En ulempe er at det er langt færre *hsp65* sekvenser enn 16S rDNA tilgjengelig i databaser og genet har mer intraspecies variasjon.

Flere områder av det 3600 bp lange *rpoB*-genet har vist seg å være egnet til artsidentifikasjon av NTM. Analyse av et område på 306 bp (posisjon 1362 – 1668) og et område på 360 bp (posisjon 902 – 1261) er brukte for identifikasjon av langsomtvoksende NTM, og et område på 760 bp (posisjon 2573 – 3337) brukt for identifikasjon av hurtigvoksende NTM.

Det er utført helgenom-sekvensering for >40 mykobakteriearter. Detaljert informasjon om pågående og fullførte prosjekter finnes på <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/>.

### Sekvens-databasesøk

Likhet med sekvenser i databasene danner grunnlaget for identifikasjon. GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) er mest brukt. Der legges alle publiserte sekvenser, og den er fritt tilgjengelig. Fordi sekvenser som legges inn i GenBank kan være dårlig validert, det ikke nødvendigvis er sekvensen som kommer ut med høyest score som er korrekt, og enkelte isolater kan ha blitt feilidentifisert, er det viktig å kritisk vurdere søkerne (6, 7). Det er derfor også anbefalt i tillegg å søke i andre databaser som EZTaxon <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>, <http://www.microbiology.hku.hk/16SpathDB/main.php> (16SpathDB 2.0: Identification of medically important bacteria by 16S rRNA sequence der 16S rDNA sekvenser til alle klinisk viktige bakterier som er beskrevet i Manual of Clinical Microbiology er validert for identifikasjon), leBIBI (<https://umr5558-bibiserv.univ->

[lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi](http://lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi) (16S, hsp65, rpoB og gyrB), Ribosomal Database Project (RDP) <https://rdp.cme.msu.edu/>, <http://hsp65blast.phsa.ca/blast/blast.html>, eller den kommersielle databasen RipSeq (Isentio, CA). Med RipSeq er det også mulig å identifisere flere bakterier i en blandingskultur.

Det er ingen etablert algoritme for besvarelse av sekvenseringsbasert identifikasjon av mykobakterier (7-10). Ved analyse av de 500 første basene i 16S rDNA anbefaler imidlertid Clinical and Laboratory Standards Institute at isolater som har 100% likhet med sekvensen til én art ved database-søk besvares med artsnavn, og de med 99 – 99,9% likhet besvares med *Mycobacterium* sp, mest lik [artsnavn] (6).

## Referanser

1. Somoskovi A, Dormandy J, Rivenburg J, Pedrosa M, McBride M, Salfinger M. Direct comparison of the genotype MTBC and genomic deletion assays in terms of their ability to distinguish between members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates and in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2008; 46:1854–1857.
2. Lara-Oya A, Rodriguez-Granger JM, Liébana-Martos MD, Mendoza-López P, Sampedro-Martínez A, Cobo F, Gutierrez-Fernández J, Martínez-Lirola MJ, Navarro-Marí JM. Preliminary evaluation of a new kit for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex species using (Speed-Oligo MTBC). *J Med Microbiol.* 2016 Jul 6. doi: 10.1099/jmm.0.000308. [Epub ahead of print]
3. Tortoli E, Pecorari M, Fabio G, Messino M, Fabio A. Commercial DNA probes for mycobacteria incorrectly identify a number of less frequently encountered species. *J Clin Microbiol.* 2010;48:307–310.
4. van Ingen J, de Zwaan R, Enaimi M, Dekhuijzen PN, Boeree MJ, van Soolingen D. Re-analysis of 178 previously unidentifiable *Mycobacterium* isolates in the Netherlands in 1999–2007. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1470–1474.
5. Ramis IB, Cnockaert M, Von Groll A, Mathys V, Simon A, Tortoli E, Palomino JC, Almeida da Silva PE, Vandamme P, Andre E, Martin A. Evaluation of the Speed-Oligo Mycobacteria assay for the identification of nontuberculous mycobacteria. *J Med Microbiol.* 2015;64:283-287.
6. Wayne, PA. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing: guideline, CLSI document MM18-A. Clinical and Laboratory Standards Institute 2008.
7. Tortoli E. Standard operating procedure for optimal identification of mycobacteria using 16S rRNA gene sequences. *Stand Genomic Sci.* 2010;3:145–152.
8. de Zwaan R, van Ingen J, van Soolingen D. Utility of *rpoB* gene sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria in The Netherlands. *J Clin Microbiol.* 2014;52:2544–51.
9. Simmon KE, Kommedal O, Saebo O, Karlsen B, Petti CA. Simultaneous sequence analysis of the 16S rRNA and *rpoB* genes by use of RipSeq software to identify *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3231–3235.
10. Joao I, Cristovao P, Antunes L, Nunes B, Jordao L. Identification of nontuberculous mycobacteria by partial gene sequencing and public databases. *Int J Mycobacteriol.* 2014;3:144-151.

## 2.9 Resistensbestemmelse av mykobakterier

Anne Torunn Mengshoel, Avdeling for tuberkulose, blod- og seksuell smitte, Nasjonalt referanselaboratorium for mykobakterier, Folkehelseinstituttet.

### Resistensbestemmelse av *M. tuberculosis*-komplekset (MTBC)

Dette er viktig for effektiv behandling av hver enkelt pasient, men også for resistensovervåking nasjonalt og internasjonalt. Den kan utføres på kultur (indirekte testing, fenotypisk testing) og på prøvemateriale som inneholder syrefaste staversom tilhører MTBC, under visse betingelser (direkte testing). Alle nye MTBC isolat i Norge undersøkes mtp resistens, dessuten bør testingen repeteres hvis fortsatt vekst etter 3 måneders behandling.

Har benyttet ECDC Handbook on TB laboratory diagnostic methods (1) og Manual of Clinical Microbiology fra ASM (2) som generelle referanser til temaene som er omtalt her.

### Fenotypisk testing av MTBC

Laboratorier som utfører resistens bestemmelse må ha god erfaring med valgte metode og erfarne teknikere som utfører den. All testing må foregå i BSL3 fasilitet. Det må rutinemessig utføres interne kvalitetskontroller (eks test ved ny batch av antibiotika) og deltagelse i eksterne kvalitetskontroll programmer er påkrevet. Identifikasjon av isolatet bør gjøres før testingen for å utelukke at det er en "non-tuberculous mycobacteria" (NTM) og identifikasjon av arten innad i MTBC er viktig for å kunne tolke PZA resultatet, siden *M. bovis* har iboende resistens. Testingen utføres på et medikament som er representativ for en gruppe ( eks rifampicin gjelder også rifapentine, prothionamid dekker ethionamid og vica-versa) eller på individuelle medikamenter (rifampicin dekker ikke rifabutin og streptomycin dekker ikke amikacin eller kanamycin). Blant førstelinje medikamentene er PZA resultatet mindre pålitelig enn for de andre. Og generelt er testingen av andrelinje medikamentene mindre standardisert enn førstelinje medikamentene.

Testingen kan utføres med ulike metoder og de kritiske konsentrasjonene kan variere og er angitt i tabellen under (fra ref 11).

**Table A.2** Updated WHO critical concentrations for elected first- and second-line agents for the treatment of tuberculosis<sup>57,58</sup>

Drug	Löwenstein-Jensen µg/ml	Middlebrook 7H10 µg/ml	Middlebrook 7H11 µg/ml	MGIT 960 µg/ml
	40.0	1.0	1.0	1.0
	0.2	0.2	0.2	0.1
	—	—	—	100.0
	2.0	5.0	7.5	5.0
	4.0	2.0	2.0	1.0
	30	5.0	6.0	2.5*
	30*	4.0*	—	1.0
Capre mycin	40	4.0*	—	2.5
Ofloxacin	4.0*	2.0	2.0	2.0
Moxifloxacin	—	0.5*	—	0.5*†
		2.0*		2.0*

\* Suggested updates from reference 58; not yet formally published by the WHO.

† Proxy for ofloxacin in case ofloxacin is not tested.

WHO = World Health Organization; MGIT = Mycobacteria Growth Indicator Tube.

#### Dagens praksis:

Alle nye MTBC isolat i Norge testes fenotypisk for førstelinje medikamentene isoniazid (INH), rifampicin (RIF), ethambutol (ETB), streptomycin (STR) og pyrazinamid (PZA). Testingen utføres på det nasjonale referanselaboratoriet for mykobakterier (NRL) ved FHI og i tillegg på OUS (Rikshospitalet og Ullevål) for stammene som isoleres der. Alle tre laboratoriene benytter Becton Dickinson BACTEC MGIT 960 systemet med flytende Middelbrook medium (7H9) til testingen. Dette er en modifisert proposjons metode med kritiske konsentrasjoner som måler vekst indirekte ved forbruk av O<sub>2</sub> som måles med fluorescens automatisk i MGIT 960 systemet. Hvis resistenstesting settes opp direkte fra et positiv MGIT rør er det viktig å være klar over at tiden fra det har flagget ut til oppsettet gjøres, er avgjørende for tilberedelse av inokulumet.

All påvist resistens blir repetert ved NRL hvis ikke mutasjon som er assosiert med resistenser påvist. Ved påvist resistens er det viktig å utelukke at det er vekst av NTM eller andre bakterier i MGIT røret.

Ved påvist MDR-TB eller annen polyresistens (resistens for 2 eller flere førstelinjemedikamenter) og ved påvist monoresistens for RIF eller INH, utføres testing ved NRL for andrelinje medikamentene amikacin (AMK), capreomycin (CAP), prothionamid (PTH), moxifloxacin (MOX) og linezolid (LIN). Kanamycin (KAN) og ofloxacin (OFX) kan testes ved behov og benyttes dessuten ved eksterne kvalitetskontroller. Rifabutin (RBT) kan også testes ved påviste *rpoB* mutasjoner som ikke er assosiert med sikker RBT resistens. Denne utvidede testing gjøres kun ved NRL og foregår også med MGIT 960 systemet med TB eXiST/EpiCenter programvare.

Alle MDR og RIF resistente (RR) isolat videresendes til Supranasjonalt referanselaboratorium (SNRL) på Folkhälsomyndigheten i Solna, for testing av cycloserin (LJ 30 mg/L), PAS (LJ 1 mg/L) og eventuelt clofazimin (MGIT 960 med primært ved 0.5 mg/L, ved resistens også ved 1 og 2 mg/L). Testing for delamanid (MGIT 960 0.125 mg/L) regner de med å ha på plass i løpet av 2016, mens testing for bedaquilin ligger litt lengre frem i tid. Disse to medikamentene er aktuelle hvis standard regime for MDR/RR-TB (3) ikke kan benyttes. I disse nye WHO anbefalingene er PAS ikke lenger en del av standard regime, og behovet for testing vil sannsynlig bli mindre. Før videresending av isolat til SNRL anbefales det å konferere med behandlende lege for å avklare hvilke medikament det er aktuelt å teste for der.

#### Forslag til anbefalinger:

Det foreslås å slutte med rutinemessig testing av streptomycin, siden medikamentet nå sjelden benyttes i behandling og det ikke ansees nødvendig å overvåke resistensforhold hverken nasjonalt eller internasjonalt. Men det bør kunne utføres hvis det allikevel er aktuelt å benytte i behandling av pasienten.

For øvrig anbefales videreføring av dagens praksis.

### Genetisk testing av MTBC

Fenotypisk resistenstesting er ansett å være gull-standard for MTBC, men genetisk testing kan gi raskere informasjon om mutasjoner og resistensforhold.

Det finnes ulike NAAT og "Line Probe Assay" (LPA) kommersielt tilgjengelig for påvisning av de vanligste mutasjonene som er assosiert med resistens for både første og andrelinje medikamentene. Sekvensering av enkelte gen blir også gjort, dessuten blir helgenomsekvensering tatt i bruk i økende grad.

I 2011 kom WHO med anbefalinger om bruk av Xpert MTB/Rif, som påviser *rpoB* mutasjoner (angir ikke hvilken mutasjon) assosiert med RIF resistens sammen med MTBC, direkte i prøvematerialet. Testen benyttes nå i mange land og en rekke publikasjoner har tilkommet. En ekspert gruppe foretok en gjennomgang av nye publikasjoner og anbefalingene ble oppdatert i 2013 (4) og en fornyet implementerings manual (5) ble utgitt i 2014. For påvisning av RIF resistent lunge TB hos voksne sammenlignet med fenotypisk påvist RIF resistens ble det funnet:

*"When used to detect rifampicin resistance, Xpert MTB/RIF achieved a pooled sensitivity of 95% (95% CrI, 90–97%) (17 studies, 555/2624 total specimens) and a pooled specificity of 98% (95% CrI, 97–99%) (24 studies, 2414 specimens, true negatives and false positives)." Og for barn med RIF resistent lunge TB: "The sensitivity of Xpert MTB/RIF to detect rifampicin resistance in specimens from children was 86% (95% CrI, 53–98%)." Ekspertgruppens konsensus anbefaling for påvisning av RIF resistent lunge TB hos voksne og barn ble derfor at: "Xpert MTB/RIF should be used rather than conventional microscopy, culture and DST as the initial diagnostic test in adults and children suspected of having MDR-TB or HIV-associated TB (strong recommendation, high-quality evidence)". Denne ekspert oppdateringen gir også anbefalinger om bruk av testen på ikke respiratorisk materiale, men her er det ikke angitt noe spesielt i forhold til påvisning av RIF resistens.*

Abbott har en RealTime MTB test som påviser MTBC (ved IS6110 og protein antigen b) og mutasjoner i *rpoB*, *katG* og *inhA* genet. Resistenspåvisningen tilsvarer GenoType MTBDRplus (se under), med unntak av at den ikke påviser spesifikke mutasjoner i *rpoB* genet, dvs tilsvarende Xpert MTB/Rif for dette genet. Testen er fra produsent godkjent for både mikroskopi positive og mikroskopi negative prøver fra nedre luftveier, men ikke for ekstrapulmonale prøver.

WHO kom allerede i 2008 med anbefaling (6) om bruk av LPA for påvisning av MDR- og RR-TB. Denne anbefalingen inkluderer både INNO-LiPA Rif.TB kit (Innogenetics, Zwijndrecht, Belgium), beregnet på M. tuberculosis kultur, og GenoType MTBDRplus assays (Hain Lifescience, GmbH, Germany), som kan benyttes på kultur og direkte i respiratorisk prøvematerialet (i hht pakningsvedlegget til MTBDRplus Ver 2.0 både mikroskopi positive og negative prøver). Begge er PCR baserte hybridiserings tester som samtidig detekterer MTBC og spesifikke mutasjoner i *rpoB* genet. GenoType MTBDRplus detekterer også spesifikke mutasjoner i *katG* genet som gir høygradig INH resistens og mutasjoner i *inhA* genet som gir lavgradig INH resistens i tillegg til prothionamid/ethionamid resistens.

I år (2016) har WHO også kommet med anbefaling (7) om bruk av GenoType MTBDRs/ versjon 2 (v2) (Hain Lifescience, GmbH, Germany) for påvisning av resistens for fluorokinolner (FLQ) og "second line injectabl drugs" (SLID) som veiledning til valg av medikamenter i behandlingen av MDR-/RR-TB. Prinsippet for denne testen ertilsvarende



som for MTBDR $plus$ . Denne versjonen påviser mutasjoner i *gyrA* og *gyrB* som er assosiert med resistens for FLQ, og mutasjoner i *rrs* og *eis* som er assosiert med resistens for SLID. Den tidligere versjonen av denne testen, GenoType MTBDRs/ versjon 1 (v1), påviste kun mutasjoner i *gyrA* og *rrs* og WHO ville ikke anbefale denne (8) til bruk for å avgjøre hvilke medikamenter som kunne benyttes i behandlingen av MDR-/RR-TB pga moderat sensitivitet for deteksjon av resistens.

Anbefalingen om bruk av MTBDRs/ v2 (SL-LPA) kom som et resultat av den økt sensitiviteten for påvisning av resistens for FLQ, SLID og XDR-TB i denne versjonen, og ønske om rask avklaring av resistens spesielt i forbindelse med introduksjon av et kortere MDR-TB regime (3), men også ved standard MDR-/RR-TB regime.

*“Given the GRADE evidence assessment and considering the relative benefits and harms associated with the use of “second line - line probe assay” (SL-LPA) to test patients with confirmed rifampicin-resistant TB or MDR-TB, WHO recommends that:*

*For patients with confirmed rifampicin-resistant TB or MDR-TB, SL-LPA may be used as the initial test, instead of phenotypic culture-based DST, to detect resistance to fluoroquinolones (Conditional recommendation; moderate certainty in the evidence for test accuracy for direct testing of sputum specimens; low certainty in the evidence for test accuracy for indirect testing of Mycobacterium tuberculosis cultures).*

*For patients with confirmed rifampicin-resistant TB or MDR-TB, SL-LPA may be used as the initial test, instead of phenotypic culture-based DST, to detect resistance to the second-line injectable drugs (Conditional recommendation; low certainty in the evidence for test accuracy for direct testing of sputum specimens; very low certainty in the evidence for test accuracy for indirect testing of Mycobacterium tuberculosis cultures).*”

De anbefaler altså at testen kan benyttes på kultur og direkte i prøvemateriale uavhengig av mikroskopi resultat og type materiale. Imidlertid blir det påpekt at det er økt sannsynligheten for inkonklusive svar, når direkte mikroskopi negative sputum prøver blir testet, og at testen ikke er tilstrekkelig evaluert for andre respiratoriske prøver enn sputum eller for ekstrapulmonale prøver. I pakningsvedlegget til testen anbefales det at kun sputum prøver testes direkte.

De påpeker at det fortsatt vil være behovet for fenotypisk resistenstesting og at dette er aktuelt ved negativt SL-LPA, spesielt ved høy pretest sannsynlighet for FLQ eller SLID resistens. De resistensmutasjonene som påvises i testen er i høy grad korrelert til fenotypisk resistens for ofloxacin (OFX) og levofloxacin (LFX), mens korrelasjonen til moxifloxacin (MXF) og levofloxacin(LFX) er usikker og fenotypisk resistensresultat vil best kunne avgjøre om disse medikamentene bør inkluderes i MDR-/RR-regime. Imidlertid er resistensmutasjonene i høy grad korrelert til fenotypiske resultat for SLID og de bør derfor ikke inkluderes i et MDR-TB regime.

I ECDC håndboka (1) er det i kapittel 6.5 om LPA, skrevet eksplisitt at testene (både MTBDR $plus$  og MTBDRs/) er validert/lisensert kun for mikroskopi positive respiratoriske prøver i tillegg til kultur, og at de ikke bør benyttes på direkte mikroskopi negativt materiale hvis ikke laboratoriet selv har validert testene for dette.

En sammenligning av de to MTBDRs/ versjonene er utført og publisert i 2016 (8) og her fant man følgende: *“The specificities in resistance detection of V1 and V2.0 were similar*

*throughout whereas the sensitivity of V2.0 was superior for FQ (94.8 vs 89.6%) and KAN (90.5 vs 59.5%), but similar for AMK (91.3%) and CAP (83.0%). Sensitivity and specificity of V2.0 were superior to those of V1 for the detection of pre-XDR (83.3 vs 75.0% and 88.6 vs 67.1%, respectively), whereas only the sensitivity of V2.0 was superior to that of V1 for the detection of XDR (83.0 vs 49.1%). In conclusion, MTBDRsl V2.0 is superior to MTBDRsl V1 and efficiently detects the most common mutations involved in resistance to FQ and aminoglycosides/CAP. However, due to mutations not recognized by V2.0 or resistance mechanisms not yet characterized (particularly mechanisms related to monoresistance to aminoglycosides or CAP), the results for wild-type strains obtained with MTBDRsl V2.0 should be confirmed by further DNA sequencing and phenotypic drug susceptibility testing.*

I 2016 ble det publisert en "TBNET/RESIST-TB consensus statement" (9). Her gis anbefalinger for bruk av molekylær resistenstesting, betydning for valg av behandling og hvordan resultatene bør rapporteres. De fokuserte på mutasjoner i genene *katG*, *inhA*, *rpoB*, *embB*, *rrs*, *rpsL* og *gyrA* som er relatert til resistens for aktuelle medikamenter in vivo. De påpeker at deteksjon av mutasjoner i disse genene vil kunne gi både falske positive og falske negative resultat, siden korrelasjonen mellom mutasjoner, fenotypisk og klinisk resistens kan være usikker og ikke alltid avklart. Rapportering av molekylære resultat bør derfor inneholde hvilken mutasjon som er påvist og hvilken betydning dette har for valg av medikamenter i behandlingsregime.

Noen få av hovedpoengene i konsensus anbefalingen er angitt punktvis under, viser for øvrig til referansen og tabellene A, B og A3 som er inkludert her.

-Molekylære metoder for påvisning av rifampicin (RMP) resistens (påvisning av mutasjoner i den 81 basepar (bp) kjerneregionen av *rpoB*) kan anses å være standard metode for påvisning av MDR-/RR-TB, selv om testene ikke dekker alle mulig mutasjoner som kan gi RMP resistens. I land med lav prevalens av MDR-TB er det viktig å være klar over at falske positive resistens resultat kan forekomme, og at RMP resistens bør bekreftes med en sekundær molekylær test eller ved fenotypisk testing.

-Selv om >90% av RMP resistente stammer også er INH resistente, er det viktig å få utført molekylær testing mtp INH resistens.

-Ved påvist *rpoB* mutasjon direkte i prøvematerialet eller når fenotypisk testing indikerer MDR-TB, bør man utføre molekylær testing for påvisning av resistens mot andre linje medikamenter for å kunne gi behandlings råd og redusere tiden for påvisning av XDR-TB.

-Mer enn 95% av RMP resistente stammer har en mutasjon i 81-bp regionen av *rpoB* genet. De vanligst mutasjonene S531L og H526Y/D, gir høygradig resistens for alle rifamycinene, mens andre mutasjoner kan gi en begrenset effekt på følsomheten for de enkelte medikamentene. Rifabutin (RBT) kan være effektivt ved enkelte mutasjoner, selv om den/de gir RMP resistens. Se tabel A og A3.

- De tilgjengelige LPA metodene som påviser INH resistens påviser mutasjoner i *inhA* posisjon -16, -15 og -8, og *katG* codon 315. Mutasjon S315T gir høygradig INH resistens (MIC>1 mg/L), men affiserer ikke følsomhet for PTH/ETH. Ved denne *katG* mutasjonen anbefales det at INH ikke benyttes i behandlingen. Derimot gir *inhA* promotor mutasjoner lavgradig INH resistens (< 1 mg/L), men påvirker følsomheten for PTH/ETH vesentlig. Ved *inhA* promotor mutasjoner kan INH, helst i høy dose (15-20 mg/kg), benyttes i kombinasjon med andre medikamenter. Graden av resistens bør bekreftes ved fenotypiske metoder.
- De ulike mutasjonene i genene som er knyttet til resistens for SLID og FLQ kan gi varierende grad av resistens for de ulike medikamentene innad i gruppen, se tabell B.
- Behandlingsanbefalinger basert på molekylære tester for andre aktuelle medikamenter; delamanid, bedaquilin, cyclosering/terizidone, PAS, meropenem/imipenem, clofazimine eller linezolid, kan ikke gjøres med dagens tilgjengelige metoder.
- Graden av uoverensstemmelser mellom molekylære og fenotypiske resistensresultat er avhengig av medikamentet som testes og gen regionen som blir undersøkt. Selv om resultatet fra fenotypisk testing ikke alltid stemmer overens med den kliniske behandlingseffekten, blir dyrknings baserte metoder fortsatt oppfattet som gullstandarden for resistenstesting blant ekspertene involvert i denne anbefalingen.

**Table A)** Clinical Implications of mutations detected by molecular methods

Mutation	Drug*		Association with <i>In vitro</i> phenotypic resistance	Association with clinical resistance	Frequency among strains categorised as resistant on the basis of critical concentration testing†
	INH	ETH			
<i>katG</i> S315T	–	+	S315T confers high-level INH resistance (MIC >1 mg/l), but does not affect susceptibility to ETH <sup>69,70,117–121</sup> . Note: there are additional mutations in <i>inhA</i> or <i>ethA</i> , which confer ETH resistance <sup>122</sup>	Indirect evidence strongly suggests that high-level resistance affects clinical outcomes. <i>katG</i> S315T mutations are associated with multidrug resistance (see e.g. <sup>119</sup> ). Limited data on direct association between <i>katG</i> S315T mutation and clinical outcome suggest increased risk of first-line treatment failure, death and relapse <sup>123,124</sup>	In a systematic review of 52 studies, 5–98% of INH-resistant isolates showed <i>katG</i> S315T mutations (median 64%, interquartile range 54–79) (Hooijer et al. unpublished)
<i>inhA</i> –16G –15T –8A/C	+	–	<i>inhA</i> promoter mutations confer low-level INH resistance (MIC <1 mg/l), but significantly affect ETH susceptibility <sup>69,70,119–121,123</sup> . Note: there are additional mutations in the structural <i>inhA</i> gene, which together with <i>inhA</i> promoter mutations result in INH MIC levels >1 mg/l <sup>125</sup>	Limited direct and indirect data, suggesting no effect on cure rates for standard first-line treatment. <sup>123,124</sup> One study showed increased relapse rates with INH-EMB (6 months) in the continuation phase; <sup>138</sup> <i>inhA</i> promoter mutations are not associated with multidrug resistance when compared to the <i>katG</i> S315T mutation, <sup>119</sup> but have been associated with XDR-TB in South Africa <sup>126</sup>	In various studies, 12–42% of INH-resistant isolates had <i>inhA</i> promoter region mutations <sup>113,119,127–139</sup>
	RMP	RBT			
<i>rpoB</i> S531L H526mut	–	–	S531L and H526D/Y confer high-level resistance to all rifamycins. <sup>131–136</sup> In contrast, mutation H526L (and possibly H526N/S) only confer low-level resistance to RMP	Strong direct and indirect evidence for association with clinical resistance <sup>128</sup>	More than 95% of RMP-resistant isolates have mutations in the 81-bp core region of the <i>rpoB</i> gene. Most studies showed mutations in codons 531 and 526 in 40–65% and 10–40% of RMP-resistant isolates, respectively <sup>127,129,137</sup>
D516mut	–	+	D516mut predominantly affects RMP, but much less so RBT; RBT is still an option for combination chemotherapy <sup>132–134,136,138</sup>		Most studies showed codon 516 and 533 mutations in 5–32% and 2–5% of RMP-resistant isolates, respectively. <sup>127,129,137</sup> Their frequencies are probably underestimated, as low-level resistant isolates may be tested as phenotypically susceptible <sup>67</sup>
L533mut	+	+	L533mut affects susceptibility to all rifamycin only slightly; RMP and RBT are still an option for combination chemotherapy <sup>134,139–141</sup>		
I572F	–	–	I572F mutations are outside the 81-bp core region <sup>142,143–145</sup>	Some studies suggest a role for this mutation in RMP resistance <sup>146,147</sup>	Among the isolates obtained from patients who did not respond to the anti-tuberculosis treatment, some isolates showed mutation at codon 572. <sup>148</sup> Cross-resistance to RBT has been described in one study <sup>149</sup>
	EMB				
<i>embB</i> M306mut	+		M306L mutation confers low-level resistance to rifampin. Implications are not clear	There have been no studies of the direct effect of <i>embB</i> 306 mutations on clinical resistance	In various studies, 20–88% of EMB-resistant isolates had <i>embB</i> 306 mutation <sup>108,127,155–159</sup>



Hot spot of *rpoB* gene: result of commercial LPA tests in the presence of mutations in codons known to host silent mutations, mutations associated with susceptible in the phenotypic MGIT DST\*

Codon	INO-LIPA®	GenoType®	AID TB Resistance	Silent mutation	MGIT-S†
505	—	W1-	—		
506	—	W1-	—		
507	—	W1-	—		
508	W1-	W1-	—	T508	
509	W1-	W1-	—		
510	W1-	W2-	—	Q510	
511	W1-	W2-	—	L511	Gln/Pro
512	W2-	W2-	—		Arg
513	W2-	W2- W3-	W1-	Q513	
514	W2-	W3-	W1-	F514	
515	W2-	W3-	W1-		
516 Val	W2- M2+	W3- W4- M1+	W1- M1+		Val
516 Tyr	—	—	W1- M1+		
516 other	W2-	W3- W4-	W1- M1+		Phe
517	W2-	W4-	W1-		
518	W3-	W4- W5-	—		
519	W3-	W4- W4-	—		
520	W3-	W4-	—		
521	W3-	W4-	—		
522	W3-	W4- W6-	—		Gln
523	W4-	W6-	W2-		
524	W4-	W6-	W2-	T524	
525	W4-	W6-	W2-		
526 Tyr	W4- M4a+	W7- M2a+	W2-		
526 Asp	W4- M4b+	W7- M2b+	W2- M2+		
526 Arg	—	—	W2- M2+		
526 other	W4-	W7-	W2- M2+		Asn/Cys/ Leu/Ser
527	W4-	W7-	W2- M2+		
528	W5-	W7-	W2-		
529	W5-	W7-	—		
530	W5-	W8-	—		
531 Leu	W5- M5+	W8- M3	W3-		
531 Trp	—	—	W3- M3+		
531 other	W5-	W8-	W3-		Tyr
532	W5-	W8-	W3- M3+	A532	
533	W5-	W8-	W3- M3+	L533	Arg/Pro†
534	—	W8-	W3-		

\* W = wild type probe; M = mutated probe; S = codon in which silent mutations have been reported. Some of the codons that could be clinically relevant, such as V116F and I572F, are not included in LPAs.

† Mutations reported associated to susceptible RMP result in the phenotypic MGIT DST.

‡ 533P can be missed by LPA.

LPA = line-probe assay; MGIT = Mycobacteria Growth Indicator Tube; DST = drug susceptibility testing; RMP rifampin.

Dagens praksis:

Testing direkte i prøvematerialet mtp MDR-TB utføres ved flere av landetslaboratorier i varierende grad. Ett laboratorium benytter MTBDR*plus* og ett laboratorium benytter RealTime MTB test fra Abbot. Flere benytter GeneXpert systemet, Xpert MTB/Rif, for påvisning av *rpoB* mutasjoner, for utvalgte prøver.

Ved NRL utføres MTBDR*plus* i mottatte kulturer ved påvist MDR-/RR-TB eller ved høy pre-test sannsynlighet for dette, eventuelt etter ønske fra innsendende laboratorium eller behandlende lege.

MTBDRs/ v2 utføres i kulturer hvis påvist MDR-/RR-TB molekylært eller fenotypiske. Begge LPA er akkrediterte analyser for bruk på kultur ved NRL. Hovedregelen er at NRL ikke undersøker direkte i prøvemateriale. Vi har tatt imot enkelte direkte mikroskopi positive respiratoriske prøver (forbehandlet med Nalc-NaOH) for undersøkelse med MTBDR*plus*, med varierende resultat. Vår erfaring er at det må være mange bakterier tilstede for at testen kan gi et resultat.

Helgenomsekvensering er under etablering ved NRL og vil sannsynlig i fremtiden være metoden som benyttes for påvisning av mutasjoner som er assosiert med resistens, men da i kombinasjon med "simple-to-use web service" som for eksempel PhyResSe (10). Foreløpig er ikke dette innført i rutinen og NRL vil fortsette dagens praksis med bruk av LPA på mottatte kulturer (flytende eller fast), som gir raske svar for de mest aktuelle mutasjonene som er assosiert med resistens.

Forslag til anbefalinger:

Alle prøver med høy pre-test sannsynlighet for MDR-TB bør testes for *rpoB* mutasjon direkte i prøvematerialet og/eller i kultur. Det vil si de pasientene som kommer fra områder med høy forekomst av MDR-TB, er nærkontakter til kjente MDR-TB pasienter og ved behandlingssvikt.

For påvisning direkte i prøvematerialet bør dette kunne gjøres innenfor helseregionen eventuelt i annen helseregion etter avtale mellom sykehusene/laboratoriene.

Spesielt ved lav pretest sannsynlighet for MDR-TB bør påvist *rpoB* mutasjon direkte i prøvematerialet bekreftes ved retesting av ny prøve, samt bekreftes ved fenotypisk resistensbestemmelse av isolatet. Ved uoverensstemmelse mellom fenotypisk og genetisk resistensresultat bør det gjøres sekvensering av *rpoB* genet, hvis det ikke er påvist spesifikk mutasjon ved LPA.

Dagens praksis for bruk av LPA ved NRL bør videreføres. Ved påvist *rpoB* mutasjon ved fravær av villtypebånd uten påvist spesifikt mutasjonsbånd, bør sekvensering utføres for å påvise den eksakte mutasjonen.

Ved bruk av molekylære metoder som påviser en spesifikk mutasjon, bør svarrapporten inneholde informasjon om hvilken mutasjon som er påvist og hvilken betydning dette har for valg av medikamenter i behandlingsregime.

Ved fravær av mutasjoner bør det fremgå av svarrapporten at dette ikke utelukker resistens for det aktuelle medikamentet, men for RIF kan man ved fravær av *rpoB* mutasjon si med stor grad av sikkerhet at stammen er sensitiv.

Spørsmål til møtet:

Bør alle pasienter med smitteførende lunge TB (direkte mikroskopi positive) testes for *rpoB* mutasjoner direkte i prøvematerialet eller på kultur uavhengig av pre-test sannsynlighet for MTB-TB?

Bør det ved påvist *rpoB* mutasjon i Xpert MTB/Rif kommenteres at resistens for RIF vil bli endelig avklart med fenotypisk testing eller ved påvisning av den spesifikke *rpoB* mutasjonen ved supplerende molekylær metode?

**Resistensbestemmelse av NTM (non-tuberculouse mycobacteria)**

Det kan være aktuelt å resistensteste klinisk relevante NTM isolat, både hurtigvoksende mykobakterier (rapid growing mycobacteri, RGM) og enkelte langsomvoksende mykobakterier, for utvalgte medikamenter. Resistenstesting kan utføres for begge grupper med buljong mikrofortynningsmetoden i hht CLSI (Clinical And Laboratory Standards Institute) standard (11). Denne standarden gir retningslinjer for RGM, *M. avium*-komplekset (MAC), *M. kansasii* og *M. marinum* i hht ATS/IDSA retningslinjene (13). For andre mykobakterier foreligger det ikke tilstrekkelig data til å kunne si noe om klinisk effekt utifra in vitro resultat.

RGM testes og rapporteres med MIC og SIR kategori for amikacin, cefoxitin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, imipenem (rapporteres ikke for *M. abscessus* og brytningspunktene er tentative for andre arter), linezolid, moxifloxacin, trim-sulfa og tobramycin (rapporteres kun for *M. chelonae*). Primært inkuberes resistenoppsettet i 3-5 dager, men induserbar makrolidresistens (ikke tilstede hos *M. chelonae*) kan ikke utelukkes før etter 14 dagers inkubering, hvis ikke resistens er påvist tidligere.

Blant de langsomtvoksende er det er først og fremst aktuelt å teste MAC for makrolider, eventuelt for linezolid og moxifloxacin (ved makrolid resistens eller allergi). For disse medikamentene rapporteres MIC og SIR kategori, men sikker sammenheng mellom in vitro resultat og klinisk respons har kun blitt vist for makrolider. Generelt er villtype (ikke tidligere behandlet) isolat følsomme for makrolider. In vitro MIC data for ethambutol, rifampicin og rifabutin har vist dårlig sammenheng med klinisk respons, og alternative midler som amikacin er ikke tilstrekkelig undersøkt. Resistenstesting av ubehandlede *M. kansasii* isolat er ikke nødvendig å gjøre rutinemessig, men ved terapi svikt anbefales det å teste primært for rifampicin og clarithromycin. Ved resistens for rifampicin er det aktuelt å teste for amikacin, ciprofloxacin, ethambutol, linezolid, moxifloxacin, rifabutin og trim-sulfa. For disse medikamentene angis det MIC og hvilken verdi som indikerer resistens. Isoniazid og streptomycin MIC kan også foreligge, men for disse midlene er det ikke etablert brytningspunkt.

Rutinemessig resistenstesting av *M. marinum* er ikke anbefalt, men kan vurderes når det fortsatt er vekst etter flere måneders behandling. De aktuelle midlene er; amikacin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline/minocycline, ethambutol, moxifloxacin, rifabutin, rifampicin og trim-sulfa. For disse medikamentene angis det MIC og hvilken verdi som indikerer resistens.

Genetisk testing for påvisning av makrolid og aminoglykosid resistens er også aktuelt. Ervervet makrolid resistens er assosiert med *rrl* mutasjoner og induserbar resistens er assosiert med tilstedeværelse av *erm* (41) gen og mutasjoner her. Resistens for aminoglykosider er assosiert med *rrs* mutasjoner.



### Dagens praksis

Resistensbestemmelse av RGM utføres ved NRL i henhold til CLSI standard, mens de langsomtvoksende videresendes per i dag til Karolinska Universitetslaboratoriet i Solna, Sverige, som benytter tilsvarende metodikk og standard.

### Forslag til anbefalinger

Innføre fenotypisk testing av langsomtvoksende mykobakterier ved NRL medtilsvarende metodikk og i hht samme CLSI standard som for de hurtigvoksende.

Innføre genetisk påvisning av resistens for aminoglycosider og makrolider (ervert og induserbar) ved NRL for RGM i *M.chelonae-abscessus*-komplekset og for arter i *M.avium*-komplekset. LPA fra Hain, NTM-DR, som påviser mutasjoner i *rrl* og *rrs*, og dessuten tilstedeværelse av *erm* (41) genet og mutasjoner her, er under validering ved NRL.

### **Referanser**

1. ECDC Technical document, Handbook on TB laboratory diagnostic methods in the European Union
2. Manual of Clinical Microbiology, ASM
3. WHO Treatment guidelines for drug resistant tuberculosis, 2016 update
4. WHO Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. Policy update. 2013.
5. WHO Xpert MTB/RIF implementation manual Technical and operational 'how-to': practical considerations  
Implementation manual. 2014.
6. WHO Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB). Expert group report. 2008.
7. WHO The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. Policy guidance. 2016
8. Brossier F et al. Performance of the New V2.0 of the GenoType MTBDRs/ Test for the Detection of Resistance to Second-Line Drugs in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. J. Clin. Microbiol. JCM.00051-16; Accepted manuscript posted online 6 April 2016,
9. Dominguez et al. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. INT J TUBERC LUNG DIS 20(1):24-42
10. Feuerriegel S et al. PhyResSE: a Web Tool Delineating *Mycobacterium tuberculosis* Antibiotic Resistance and Lineage from Whole-Genome Sequencing Data. Journal of Clinical Microbiology June 2015 Volume 53 Number 6
11. CLSI standard M24-A2 Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard-Second Edition. March 2011.

12. Griffith DE et al. An official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 175. Pp 367-416, 2007

13. Antimicrobial Susceptibility Testing, Drug Resistance Mechanisms, and Therapy of Infections with Nontuberculous Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews* July 2012 Volume 25 Number 3 p. 545-582.

## 2.10 Molekylærepidemiologisk undersøkelse av *M. tuberculosis*

Vegard Eldholm, Avdeling for molekylærbiologi, Folkehelseinstituttet.

Molekylærepidemiologiske metoder er verktøy for å sannsynliggjøre eller avkrefte transmisjonslinker mellom TB pasienter. Det er også nyttig for å avdekke krysskontaminasjon i laboratoriet og dessuten for å kunne skille reinfeksjon fra reaktivering.

Fra rundt 1990 og frem til ca 2005 var RFLP (restriction fragment length polymorphism) - typing standard metode innen TB molekylærepidemiologi. Denne metoden baserer seg på insersjonssekvensen IS6110. Dette er et transposon som forflytter seg rundt på *M. tuberculosis* (Mtb) genomet. Derfor varierer antall og plassering av IS6110 elementer mellom Mtb stammer. Metoden er relativt arbeidskrevende og standardisert tolkning av resultater er vanskelig. Spoligotyping er en metode som baserer seg på deteksjon av korte sekvenser i det såkalte direct-repeat (DR) locuset. Dette locuset består av identiske 36-basepar sekvenser, der de identiske repetisjonene er brutt opp av variable sekvenser på 35-41 bp størrelse. Spoligotyping identifiserer fravær / tilstedeværelse av 43 av disse variable sekvensene ved hjelp av PCR etterfulgt av Southern blotting (kit-basert). Metoden er rask og enkel men har lav oppløsning (skiller dårlig mellom stammer).

Fra ca 2005 har MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units, også kalt MIRU-VNTR eller VNTR (Variable Number Tandem Repeats)) gradvis tatt over som standard molekylærepidemiologisk metode. Denne metoden har noen vesentlige styrker relativt til RFLP; den er hurtig, standardiserbar og dessuten er resultatene enkle å dele samt lagre i databaser. MIRU loci er 40-100 bp lange DNA elementer som ofte eksisterer som multiple repetisjoner (Supply et al 2000 Mol Microbiol). Slike elementer muterer relativt hurtig ved at repetisjoner øker eller minker i antall. Den molekylære bakgrunnen for dette er antagelig at polymerasen som er ansvarlig for å replikere bakteriegenomet ved celledeling har problemer når den skal replikere repeterte sekvenser. Én sannsynlig forklaringsmodell kalles "slipped-strand mispairing" (se feks Levinson et al 1987 Mol Biol Evol). Databasen MIRU-VNTRplus er et nyttig verktøy for å sammenligne egne stammer med stammer som er meldt inn internasjonalt. Det er dog svært varierende rutiner fra land til land når det gjelder deling av nasjonale MIRU-resultater gjennom denne databasen. Da MIRU resultater lett kan konverteres til numeriske formater eller koder er de likevel enkle å dele på tvers av landegrensler, og de blir rapportert til det europeiske overvåkningssystemet TESSy (The European Surveillance System). I januar 2016 ble det utgitt en «Surveillance report for Molecular typing for surveillance of multidrug-resistant tuberculosis in the EU/EEA» fra ECDC.

Standard metode for MIRU typing, som også brukes ved FHI, kartlegger 24 MIRU loci som er spredt rundt på Mtb genomet (Supply et al 2006 J Clin Microbiol). Selv om dette er et svært nyttig verktøy, er identiske MIRU mønstre på ingen måte en garanti for at en direkte kobling eksisterer mellom to pasienter, eller at disse er del av en pågåendesmittekjede.

Ved FHI kombinerer man epidemiologiske data fra smittesporing med molekylære data for å kartlegge mulige og potensielle smitte-episoder og utbrudd. Siden slutten av 2015 har vi også begynt å ta i bruk «short read sequencing» / neste generasjons DNA sekvensering (NGS) som en komplimentær metode. Denne sekvenseringen utføres ved FHI på Illumina MiSeq platformen Dette skal nå gjøres på alle mottatt Mtb stammer, og rutiner for bruk av

resultatene fra NGS er nå under utvikling og implementering. Med NGS kan man med mye større sikkerhet identifisere aktive smittekjeder, men man kan fortsatt ikke enkelt svare på spørsmål som "hvem smittet hvem". Metoden er også svært effektiv for deteksjon av resistensmutasjoner. Det jobbes for tiden internasjonalt med validering og standardisering av NGS for TB-overvåkning.

Molekylærepidemiologisk metodikk er et spennende felt i hurtig utvikling, og på FHI legger vi ned mye energi i å ligge i front på dette området.

### **Referanser**

ECDC Technical document, Handbook on TB laboratory diagnostic methods in the European Union, Stockholm, March 2016

Supply et al Mol Microbiol (2000) 36:762-71.

Levinson et al Mol Biol Evol (1987) 4:203-221.

Supply et al. J Clin Microbiol (2006) 44::4498-4510

## 2.11 IGRA – interferon gamma release assays

Anne-Marte Bakken Kran, Mikrobiologisk avd. OUS Ullevål

### Bakgrunn:

IGRA er en samlebetegnelse på immunologiske blodtester som måler sekresjon av interferon gamma (IFN-g) etter spesifikk *in vitro* stimulering av T celler. Disse testene er først og fremst anbefalt for diagnostikk av latent tuberkulose (LTB), men benyttes også i smitteoppsporinger og som supplement ved utredning av aktiv tuberkulose (1).

Forbyggende behandling ved latent tuberkulose (LTB) kan forhindre utvikling til aktiv tuberkulose, men utfordringen ligger å identifisere de pasientene som har nytte av slik behandling. Diagnostikk av LTB er vanskelig av flere årsaker; personer med LTB er asymptomatiske, det finnes ikke sikre kliniske kriterier, røntgenundersøkelser alene gir ikke diagnosen, og det finnes ingen gullstandard for laboratoriediagnostikk. Tidligere var tuberkulintest/Mantoux (TST) viktigste diagnostiske test for LTB, men metoden har betydelige begrensninger slik som kryssreaktivitet med BCG og NTM, samt boostereffekt ved gjentatt testing. TST har de senere år i praksis blitt erstattet med Interferon-gamma release assays (IGRA), i praksis Quantiferon TB Gold in tube (QFT). Selv om IGRA i dag likestilles med TST som første test, velger mange QFT som første test fremfor en to-trinns algoritme med TST primært. Mens TST kunne håndteres i primærhelsetjenesten, utføres QFT ved landets mikrobiologiske laboratorier, og blir dermed en oppgave for spesialisthelsetjenesten.

Tilgjengelige IGRA for tuberkulose i dag er Quantiferon TB Gold In tube (QFT) og T-spot TB, og en ny versjon av QFT er like rundt hjørnet. Begge testene innebærer en stimulering av T celler *in vitro* med peptidantigener spesifikke for M. tuberculosis komplekset (ESAT-6 og CFP-10).

For QFT er antigenene tilsatt prøvetakingsrørene på forhånd. Det tas alltid tre rør (fullblod); selve prøven (tilsatt peptider fra ESAT-6 og CFP-10), negativ kontroll (uten antigen), og positiv kontroll (mitogen). Primærrørene inkuberes i 16-24 timer før IFN- $\gamma$  i plasma måles ved hjelp av ELISA-teknikk. Testen utføres i dag ved alle regionslaboratorier og enkelte andre større mikrobiologiske laboratorier. I 2016 ble Quantiferon TB Gold Plus lansert. Dette er en nyere versjon av testen som etterhvert trolig vil erstatte QFT-Gold. Denne testen inneholder de samme antigenene som QFT-Gold, men i tillegg til positiv og negativ kontroll, er det to ulike antigenrør med peptider i ulik lengde for optimal stimulering av hhv. CD4+ og CD8+ T celler (2).

T-spot TB er en ELISPOT test som er mer arbeidskrevende å utføre. Antigenene er de samme som for QFT, men her isoleres mononukleære celler fra blod før cellene stimuleres med antigen. Testen måler antall IFN-g produserende celler med ELISPOT teknikk. Analysen utføres i dag kun ved referanselaboratoriet ved FHI.

**Problemstillinger:**

- 1) Årsaker til testvariabilitet
- 2) Hvordan bør resultat av testen rapporteres
- 3) Indikasjoner for undersøkelsen
- 4) Klinisk betydning og nytteverdi

I praksis utføres det få tester med T-spot TB i Norge i dag, så denne gjennomgangen vil legge hovedvekt på QFT. T-spot TB diskuteres kort mot slutten.

**Status for problemstilling i dag: Oppdatering og nykunnskap:***1) Årsaker til testvariabilitet:*

Det er betydelig variabilitet i testresultater for IGRA, og årsakene kan være preanalytiske, analytiske, postanalytiske, biologiske, eller skyldes variasjon i kit/lot. Eksempler på faktorer som er nevnt å kunne påvirke resultatet: Prøvetaking, rekkefølge av rør, tidspunkt på døgnet, blodvolum, tube shaking, tid til inkubering, varighet av inkubasjon, analytiske feilkilder, biologisk variasjon (3). De enkeltfaktorene som ser ut til å påvirke resultatet mest, er variabilitet i tid før inkubering, og variasjon i blodvolum som benyttes. Forsinkelse fra prøven tas til inkubering starter ser ut til å gi lavere IFNg-respons, og det samme gjør større blodvolum (likevel innenfor produsentens anbefalinger) (4). Selv under like betingelser, ser man variasjon i kvantitative resultater, og det ytterligere variasjon hos samme individ med få ukers intervall. Nyere studier kan faktisk tyde på at man med IGRA finner en høyere andel falske omslagere enn ved TST (5).

*2) Hvordan bør resultat av testen rapporteres:*

Resultater bør rapporteres både kvantitativt og kvalitativt (positiv, negativ, inkonklusiv eller grenseverdi). Det kvantitative svaret som rapporteres skal være IFNg-verdien i antigenrøret fratrukket bakgrunnsnivå av IFNg (målt i negativt kontrollrør), dvs verdi av TBag fratrukket Nil. Verdien oppgis i IU/mL. Laboratoriets kommentarer bør ta høyde for usikkerheten i tolkningen av resultatene, og understreke at resultatene alltid må sees i sammenheng med klinikk, resultat av annen diagnostikk og pasientens totale risiko. Mitogenrøret (positiv kontroll) er en kontroll på at prøven er adekvat forbehandlet, og at pasienten er i stand til å produsere tilstrekkelig med IFNg. Dersom mitogenresponsen er for lav, vil resultatet blir inkonklusivt. IFNg nivået i mitogenrøret vil vanligvis være høyere enn det kvantitative området for testen, så i de høyere områdene vil ikke IFNg-verdien være kvantitativt korrekt. Det kan allikevel diskuteres om det er hensiktsmessig å kommentere prøver der mitogenresponsen er dårlig men allikevel gir gyldig testresultat, da lav verdi i mitogenrøret kan være uttrykk for større usikkerhet i testen ved negativt resultat.

### 3) Indikasjoner for undersøkelsen:

Det ble i 2007 utarbeidet norske retningslinjer for bruk av IGRA (6). Siden den gang har QFT blitt lettere tilgjengelig, og de fleste laboratorier har etablert rutiner for automasjon som muliggjør analyse av et høyere antall prøver. Allikevel må man huske på at QFT stadig er en ressurskrevende analyse, og at analysens prediktive verdi avhenger av pretest sannsynlighet i testpopulasjonen. Det er derfor ønskelig med hensiktsmessige og velbegrunnede indikasjoner for undersøkelsen.

Hovedindikasjonen for IGRA er diagnostikk av LTB. Målet med diagnostikk av LTB er å identifisere personer som har reell risiko for å utvikle aktiv TB. Derfor anbefales det at testing forbeholdes tilfeller som vil ha nytte av behandling, dvs. der et positivt testresultat vil medføre at pasienten tilbys behandling (3). Grupper som er aktuelle å teste for LTB, er personer som kommer fra høyendemiske områder (inkludert flyktninger og asylsøkere), og personer som er eller kommer til å bli immunsupprimert. Av de sistnevnte, utgjør pasienter som skal starte immunosuppressiv behandling med TNFa-hemmere en økende gruppe. Det er ikke anbefalt å teste voksne, immunkompetente personer med lav risiko for å utvikle aktiv TB pga lav positiv prediktiv verdi av testen, og usikker gevinst av forebyggende behandling i denne gruppen (7).

IGRA er også anbefalt som ledd i smitteoppsporinger, og foreløpige data kan tyde på at QFT Plus vil være enda bedre enn QFT ved nylig infeksjon (8). IGRA anbefales ikke ved spørsmål om aktiv tuberkulose. Nyttverdien av dette er tvilsom fordi resultatene kan være vanskelige å tolke. Det er kjent at personer med aktiv tuberkuløs sykdom kan ha falsk negativ IGRA.

### 4) Klinisk betydning og nytteverdi:

IGRA er trolig bedre enn TST, men er allikevel ingen gullstandard for latent tuberkulose. Testene har god negativ prediktiv verdi hos immunfriske voksne, men data for barn og immunsvekkede er stadig usikre (9). Det er ikke holdepunkter for at IGRA kan predikere utvikling til aktiv TB. IGRA er et viktig verktøy for diagnostikk av LTB, men resultatene må alltid sees i sammenheng med klinikk, resultat av annen diagnostikk og pasientens totale risiko.

*T-spot TB:* Hvilken rolle T-spot TB skal ha i denne diagnostikken bør diskuteres. I praksis brukes testen lite. Det er spesielle rutiner for prøvetaking og forsendelse, analysen utføres kun ved FHI, indikasjonene for undersøkelsen er ikke tydelige, og det er uklart hvilken tilleggsinformasjon testen gir utover QFT. Bør man supplere med T-spot TB oftere enn man gjør i dag? Studier pågår for å undersøke om QFT-plus kan være bedre enn QFT hos immunsupprimerte. En hypotese er at måling av CD8+ respons øker sensitiviteten hos pasienter med redusert CD4+ T cellerespons. (Barcellini 2016). Man bør muligens avvente flere resultater fra disse studiene før man evt utvider dagens praksis for bruk av T-spot TB.

### Forslag til anbefalinger:

Det er betydelig variabilitet i resultatene av QFT, både biologisk variasjon og testvariabilitet. Det er derfor grunn til å tolke verdier nær cutoff med forsiktighet. Det anbefales at laboratoriene etablerer gråsoner.

Resultater bør rapporteres både kvalitativt og kvantitativt (verdi av TBag fratrukket Nil).

Laboratoriets kommentarer bør ta høyde for usikkerheten i tolkningen av resultatene, og understreke at resultatene alltid må sees i sammenheng med annen diagnostikk.

QFT anbefales for diagnostikk av latent tuberkulose, og testen bør benyttes hovedsaklig der et positivt testresultat vil medføre at pasienten tilbys behandling. QFT er et nyttig verktøy ved smitteoppsporing. IGRA anbefales ikke ved diagnostikk av aktiv TB.

Det anbefales at laboratoriene forbereder overgang fra QFT Gold til QFT Plus.

Testene har god negativ prediktiv verdi hos immunfriske voksne, men data for barn og immunsvekkede er stadig usikre.

Det er ikke holdepunkter for at IGRA kan predikere utvikling til aktiv TB.

### Referanser:

1. Tuberkuloseveilederen. <https://www.fhi.no/nettpub/tuberkuloseveilederen>
2. Hoffmann H, Avsar K, Göres R, Mavi SC, Hofmann-Thiel S. Equal sensitivity of the new generation QuantiFERON-TB Gold plus in direct comparison with the previous test version QuantiFERON-TB Gold IT. *Clin Microbiol Infect.* 2016 Aug;22(8):701-3. doi: 10.1016/j.cmi.2016.05.006. Epub 2016 May 13.
3. Pai M, Denkinger CM, Kik SV, Rangaka MX, Zwerling A, Oxlade O, Metcalfe JZ, Cattamanchi A, Dowdy DW, Dheda K, Banaei N. Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jan;27(1):3-20. doi: 10.1128/CMR.00034-13. Review.
4. Tagmouti S, Slater M, Benedetti A, Kik SV, Banaei N, Cattamanchi A, Metcalfe J, Dowdy D, van Zyl Smit R, Dendukuri N, Pai M, Denkinger C. Reproducibility of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) release Assays. A systematic review. *Ann Am Thorac Soc.* 2014 Oct;11(8):1267-76. doi: 10.1513/AnnalsATS.201405-188OC. Review.
5. Banaei N, Gaur RL, Pai M. Interferon Gamma Release Assays for Latent Tuberculosis: What Are the Sources of Variability? *J Clin Microbiol.* 2016 Apr;54(4):845-50. doi: 10.1128/JCM.02803-15. Epub 2016 Jan 13. Review.
6. Dyrhol Riise et al. Anbefalinger for bruk av Interferon-gamma Release Assays (IGRA) ved diagnostikk av tuberkulose i Norge. FHI 2007.
7. Landry J, Menzies D. 2008. Preventive chemotherapy. Where has it got us? Where to go next? *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 12:1352–1364.
8. Barcellini L, Borroni E, Brown J, Brunetti E, Campisi D, Castellotti PF, Codecasa LR, Cugnata F,



- Di Serio C, Ferrarese M, Goletti D, Lipman M, Rancoita PM, Russo G1, Tadolini M, Vanino E, Cirillo DM. First evaluation of QuantiFERON-TB Gold Plus performance in contact screening. *Eur Respir J*. 2016 Jul 7. pii: ERJ-00510-2016. doi: 10.1183/13993003.00510-2016. [Epub ahead of print].
9. Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, Lange C, Losi M, Markova R, Migliori GB, Nienhaus A, Ruhwald M, Wagner D, Zellweger JP, Huitric E, Sandgren A, Manissero D. Interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2011 Jan;37(1):88-99. doi: 10.1183/09031936.00115110. Epub 2010 Oct 28. Review.

### 3 INNLEGGENE PÅ MØTET

# PRØVETAKING OG FORSENDELSE

Mogens Jensenius

infeksjonsmedisinsk avdeling

OUS, Ullevål

## Generelt

- Adekvate mikrobiologiske prøver må sikres før behandling
- Nødvendig for
  - sikker diagnose
  - resistensbestemmelse
  - vurdering av smittsomhet

## Norwegian recommendations

- 3 samples drawn on 3 separate days recommended for
  - Sputum (morning)
  - Gastric juice aspirate (morning)
  - Urine (morning)
  - Feces

## Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review

S. R. Mase,<sup>\*\*</sup> A. Ramsay,<sup>‡</sup> V. Ng,<sup>§</sup> M. Henry,<sup>¶</sup> P. C. Hopewell,<sup>\*\*</sup> J. Cunningham,<sup>‡</sup> R. Urbanczik,<sup>#</sup> M. D. Perkins,<sup>\*\*</sup> M. A. Aziz,<sup>||</sup> M. Pajit<sup>††</sup>

<sup>\*</sup> Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, San Francisco General Hospital, University of California, San Francisco, California, USA; <sup>†</sup> Francis J Curry National Tuberculosis Center, University of California, San Francisco, California, USA; <sup>‡</sup> United Nations Children's Fund/United Nations Development Programme/World Bank/World Health Organization (WHO) Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDRT), WHO, Geneva, Switzerland; <sup>§</sup> Albany Medical College, Albany, New York, USA; <sup>¶</sup> County of Sacramento Department of Health and Human Services, Sacramento, California, USA; <sup>#</sup> WHO Tuberculosis Laboratory Consultants Group, Schoenberg, Germany; <sup>\*\*</sup> Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND), Geneva, Switzerland; <sup>††</sup> Stop TB Department, WHO, Geneva, Switzerland; <sup>||</sup> Department of Epidemiology & Biostatistics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

## Results

- 37 eligible studies
- Average sample size 5 - 11 650 patients
- 37 studies utilized Ziehl-Neelsen and 13 used fluorescence microscopy
- In most studies no information on sputum characteristics, timing, manner of sputum collection etc

## Results

- Overall weighted average percentage of all cases detected by 1 sputum was **85.8%**

## Results

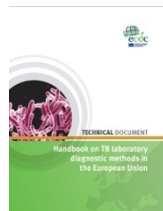
- Overall weighted average percentage of all cases detected by 1 sputum was 85.8%
- With the second sputum specimen, the average incremental yield was **11.9% (~94%)**

## Results

- Overall weighted average percentage of all cases detected by 1 sputum was 85.8%
- With the second sputum specimen, the average incremental yield was 11.9% (~94%)
- With the third specimen (when the first two were negative), the incremental yield was **3.1% (~97%)**

## Consequences

- Based on this evidence, WHO has recommended that two sputum samples in a single day be used to diagnose pulmonary TB in settings where a well-functioning External Quality Assessment system is in place, the workload is high and human resources are limited



## Kroppsvæsker vs. biopsier

## Mistanke om TB pleuritt



## Pleuratapping

- Så mye som mulig, minst 50 ml
- <30% er dyrkingspositive



### Pleurabiopsi

- Biopsi ved mistanke om tuberkuløs pleuritt
  - transcutan
  - thorascopisk
- Positiv dyrkning hos 40-80%



### Mistanke om peritoneal TB



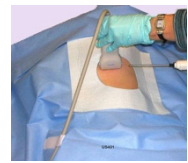
### Ascites fluid samples

- Direct smear for Ziehl-Neelson stain has a reported sensitivity of 0 to 6 percent
- In most series, the frequency of a positive ascites culture is disappointingly less than 20 percent.



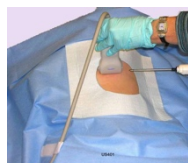
### Målrettet peritoneal biopsi

- Ultralydveiledet
- Laparoskopisk

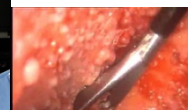


### Peritoneal biopsi

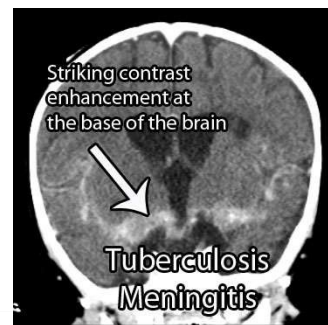
- Ultralydveiledet
- Laparoskopisk



Målrettet biopsi positiv  
Syrefaste stav  
Kultur virkning positiv

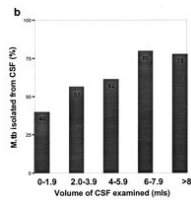


### Mistanke om TB meningitt



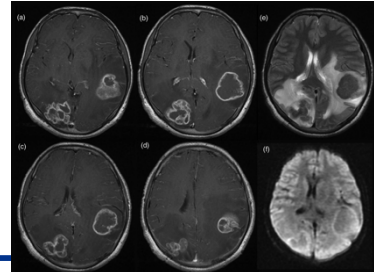
## Spinalvæske

- Ta helst 5 ml (voksne)
- Andel positiv dyrking avhengig av volum



## Biopsi

- Kun aktuelt ved tuberkulom



## Mistanke om miliær TB eller systemisk infeksjon med NTM



- Blodkultur og beinmargaspirat
- Bruk spesialmedier for mykobakterier (f.eks. BACTEC MYCO/F)
- Oppbevares i romtemperatur til transport

Takk til dr Arne Brantsæter for lån av slides

## Strategimøte i bakteriologi 2016 Mykobakteriediagnostikk

Heidi Syre  
Stavanger universitetssjukehus

Har kvaliteten på prøver fra nedre luftveier betydning for andel prøver med påvist mykobakterier ved mikroskopisk undersøkelse, nukleinsyre amplifikasjonstest og dyrkning?

### Vurdering av ekspektoratprøver og indusert sputum før diagnostikk av mykobakterier

- To måter å vurdere kvalitet
  - Makroskopisk vurdering
  - Mikroskopisk vurdering
- Få og til dels dårlige studier
- Ho *et al* 2015: Oversiktsartikkel
  - For sparsomme og heterogene data til å konkludere

### Vurdering av ekspektoratprøver og indusert sputum før diagnostikk av mykobakterier

- Makroskopisk vurdering
  - God kvalitet (WHO): Purulent, lett blodtilblandet, mukoid
  - Dårlig kvalitet (WHO): Klar, vandig, bobler
- Tre studier
  - Sammenlignet makroskopisk kvalitet med mykobakterier påvist ved mikroskopi eller dyrkning
  - Beregnet antall prøver vurdert som inadekvate med mykobakterier påvist
    - Stor variasjon (0.2% – 17.6%)
    - Ulike kriterier for vurdering av kvalitet
    - Ulike konklusjoner

### Vurdering av ekspektoratprøver og indusert sputum før diagnostikk av mykobakterier

- Mikroskopisk vurdering

Publikasjon	Mikroskopisk vurdering	Totalt antall prøver / Antall positive prøver (%)	Antall prøver med mykobakterier påvist i prøver vurdert som inadekvate (%)
Khan et al 2009	5 ulike måter (McCarter, Van Scoy, Geckler, Murray, Bartlett)	2562 / 360 (14%)	Se tabell (3-12%)
Lee et al 2015	Murray and Washington Antall leukocytter (>25)	228 / 58 (25%) / 78 (34%)	31 av 145 (21%) 45 av 145 (31%) 16 av 101 (16%) 26 av 101 (26%)
Curione et al 1977	≥10 leukocytter og <25 plateepitel	400 / 34 (8.5%)	11 av 214 (5%)
McCarter et al 1996	Plateepitelceller < leukocytter	873 / 67 (7.7%) / 142 (16%)	37 av 67 (55%) 78 av 142 (55%)
Isaac-Renton et al 1985	Murray and Washington	644 / 21 (3.3%) / 42 (6.5%)	4 av 432 (0.9%) 13 av 432 (3.0%)
Pahl et al 1993	Mirachi	299 / 37 (12%)	1 av 146 (0.7%)
Havlik et al 1995	≥10 leukocytter og <25 plateepitel	391 / 88 (22.5%)	42 av 173 (24%)

### Vurdering av ekspektoratprøver og indusert sputum før diagnostikk av mykobakterier

- Mikroskopisk vurdering

Publikasjon	Mikroskopisk vur	Publikasjon	Prøver vurdert som inadekvate med mykobakterier påvist %	prøver med mykobakterier i prøver vurdert som inadekvate (%)
Khan et al 2009		Khan et al 2009	3-12%	
Khan et al 2009	5 ulike måter (McCarter, Van Scoy, Geckler, Murray, Bartlett)	Lee et al 2015	21%	Se tabell (3-12%)
Lee et al 2015	Murray and Wash	Lee et al 2015	31%	31 av 145 (21%)
Lee et al 2015	Antall leukocytter (>25)	Curione et al 1977	16%	45 av 145 (31%)
Curione et al 1977	≥10 leukocytter og plateepitel	Curione et al 1977	26%	16 av 101 (16%)
McCarter et al 1996	Plateepitelceller < leukocytter	McCarter et al 1996	5%	26 av 101 (26%)
McCarter et al 1996	Plateepitelceller < leukocytter	McCarter et al 1996	55%	11 av 214 (5%)
Isaac-Renton et al 1985	Murray and Wash	Isaac-Renton et al 1985	55%	37 av 67 (55%)
Pahl et al 1993	Mirachi	Isaac-Renton et al 1985	0.9%	78 av 142 (55%)
Havlik et al 1995	≥10 leukocytter og <25 plateepitel	Pahl et al 1993	3.0%	4 av 432 (0.9%)
		Havlik et al 1995		13 av 432 (3.0%)
		Havlik et al 1995	24%	1 av 146 (0.7%)
				42 av 173 (24%)

**Table 2** Total and acid-fast bacilli (AFB)-positive specimens rejected by each quality assessment criterion

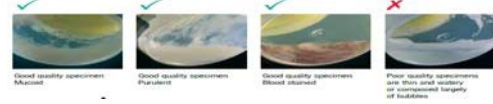
Criteria	Number rejected n = 2562 A	% Rejected (95% CI)	AFB +ve specimens rejected B	% +ve rejected out of all specimens rejected (95% CI) B/A
Visual	403	16% (14.3–17.1)	1	0.2% (0.2–0.7)
McCarter	344	13% (12.1–14.7)	10	3% (1.1–4.7)
Van Scoy	756	30% (27.7–31.3)	43	6% (4.0–7.3)
Geckler	1129	44% (42.1–45.0)	125	11% (9.2–12.9)
Murray	1695	66% (64.3–68.0)	201	12% (10.3–13.4)
Bartlett	1550	60% (58.6–62.4)	140	9% (7.6–10.5)

Khan et al 2009

### Vurdering av ekspektoratprøver og induisert sputum før diagnostikk av mykobakterier

- WHO 2013

- Salka specimens must be reported on the laboratory request form.



- ECDC 2016

- Upon arrival in the laboratory, the quality of sputum samples should be assessed and reported on the referral form. TB-positive sputa can vary in colour and aspect. If the sample is liquid and is clear and water-like, without particles, the presence of mycobacteria is possible. The presence of particles in the sample is reported on the result form. If the presence of particles is reported, the sample is not a specimen, however, even salka can yield positive results. All specimens should be processed, except for broken or leaking containers which should be discarded and another specimen requested.

- Manual of Clinical Microbiology 2011

- Processing of appropriate clinical specimens for mycobacteria is a role of microbiologists and personnel. There are a few reasons why a specimen should not be accepted and clinical should be notified: (i) too small an amount submitted; (ii) specimens consisting of salka; (iii) ... Clinical staff must be properly trained to prevent submission of unacceptable specimens.

### Vurdering av ekspektoratprøver og induisert sputum før diagnostikk av mykobakterier

#### Forslag til anbefalinger:

- Det anbefales at ekspektoratprøver vurderes makroskopisk av laboratorieansatte med tanke på kvalitet og prøve kvaliteten rapporteres på svarbrevet. Ved dårlig prøve kvaliteten bør det oppfordres til ny prøve dersom det er mistanke om aktiv lunge-tuberkulose. Ingen prøver bør avvises.
- Rekvirent bør vurdere prøve kvaliteten makroskopisk umiddelbart etter prøvetaking og eventuelt ta ny prøve ved dårlig kvalitet. Purulente prøver er av god kvalitet, mens prøver med vandig utseende er av dårlig kvalitet.
- Det anbefales ikke at kvaliteten av ekspektoratprøver vurderes mikroskopisk før diagnostikk av mykobakterier.



## Direkte mikroskopi av mykobakterier

Strategimøte om mykobakterier  
26/10-16

Astri Lervik Larsen  
Overlege fagområde mikrobiologi  
Sykehuset Østfold

## Mikroskopi

- Anbefalt metode
- Bruk av kvalitetskontroll
- Direkte mikroskopi før eller etter forbehandling?
- Cytospin
- Prøvepreparering uten P3 fasiliteter
- Antall synsfelt
- Hvordan kvantitere
- Resultatrapportering
- Hvilke prøvematerialer bør mikroskoperes
- Isolering

## Referanser



## Anbefalt metode



- Ziehl-Neelsen
  - Lettere å lære seg (morfologi)
  - Bedre til hurtigvoksende mykobakterier
- Auramin
  - 10% bedresensitivitet
  - Lik spesifisitet
  - Raskere



## Anbefalt metode



Forslag til konklusjon for laboratorier som baserer seg på mikroskopi som direkte påvisning:

Strategimøtet anbefaler fluorescensmikroskopi av auramin-farget preparat. ZN-metode er fortsatt et godt alternativ.

Auramin-metoden kan være vanskelig å lære seg, og laboratorier som skal gå over fra ZN-metode til auramin må gjøre en grundig validering før endringen innføres.

For laboratorier som primært benytter genteknologiske metoder spiller det mindre rolle hvilken fargemetode som velges.

Ved spesiell mistanke om hurtig voksende mykobakterier bør det benyttes ZN-farging. vurder sikkerhet/farging dersom negativt preparat.



## Bruk av kvalitetskontroll

Bør benyttes av alle laboratorier for å kontrollere egne fargemetoder

### Forslag til konklusjon:

Strategimøtet anbefaler at man som et minimum benytter kvalitetskontroll når ny batch av fargereagens tas i bruk.

Resultatene bør loggføres.

Alle laboratorier som utfører mikroskopi bør dessuten delta i eksternt kvalitetssikringsprogram.

### Direkte mikroskopi før eller etter forbehandling?

- Før:
  - WHO
- Etter:
  - Clinical Microbiology Procedures Handbook
  - Manual of Clinical Microbiology
  - Kanadiske retningslinjer
  - CDC
  - Publiserte studier kan tyde på at sensitiviteten øker noe ved mikroskopi etter forbehandling.

### Direkte mikroskopi før eller etter forbehandling?

Forslag til konklusjon:

Strategimøtet anbefaler at mikroskopi utføres på forbehandlet materiale.

### Cytospin

- Få publikasjoner
- Omtales ikke i veilederne fra WHO eller ECDC
- Forslag til konklusjon:

Strategimøtet mener at det ikke er tilstrekkelig evidens til å gi en klar anbefaling på dette punktet. Det får bli opp til hvert enkelt laboratorium om man ønsker å ta metoden i bruk.

### Prøvepreparering uten P3 fasiliteter

Arbeidsmiljøloven: arbeid med mikroorganismer tilhørende smitterisikogruppe 3 skal foregå i laboratorium med inneslutningsnivå 3.

Mykobakterier tilhørende *M. tuberculosis* komplekset tilhører smitterisikogruppe 3.

### Prøvepreparering uten P3 fasiliteter

- Vanlig å skille mellom arbeid med prøvematerialer og arbeid med kultur.
- Risikovurdering

#### Forslag til konklusjon:

Laboratorier som ikke har inneslutningsnivå 3 kan likevel utføre direkte mikroskopi og PCR-undersøkelse på prøvematerialet. Dette forutsetter at all håndtering av prøvematerialet foregår i biologisk sikkerhetskabinett.

### Antall synsfelt

- CMPH: 300 synsfelt
- MCM: ZN 300, IF 30
- Stop TB: ZN 100/1 langside/5 min, IF 1 langside
- ECDC: ZN 100/1 langside, IF 30-40 synsfelt/1 langside

## Antall synsfelt

### Forslag til konklusjon:

Strategimøtet velger å slutte seg til anbefalingene fra ECDC. 100 synsfelt ved ZN-metode, ca 5 minutters tidsbruk per preparat virker fornuftig. Ved IF mikroskopi vil 30 og 40 synsfelt være tilstrekkelig, med henholdsvis 20- og 40 x forstørrelse.

## Hvordan kvantitere

ZN Antall syrefaste staver	IF (25 x forstørrelse) Antall syrefaste staver	IF (45 x forstørrelse) Antall syrefaste staver	
1-2 per 20synsfelt	1-2 per 20synsfelt	1-2 per 70synsfelt	Usikkert, gjenta
1-9 per 100synsfelt	1-9 per 20synsfelt	1-19 per 50synsfelt	1+
1-9 per 10synsfelt	1-9 per synsfelt	4-36 per 10synsfelt	2+
1-9 per synsfelt	10-90 per synsfelt	4-36 per synsfelt	3+
>9 per synsfelt	>90 per synsfelt	>36 per synsfelt	4+

Manual

ZN Antall syrefaste staver	IF (20 x forstørrelse) Antall syrefaste staver	IF (40 x forstørrelse) Antall syrefaste staver	
1-4 per lengde	1-4 per lengde	1-2 per lengde	Bekreftelse påkrevd
1-9 per 200 synsfelt	1-9 per lengde 10-	3-24 per lengde	Sparsomt, angiantall
1-9 per 100 synsfelt	1-9 per synsfelt	1-6 per synsfelt	1+
1-10 per synsfelt (minst 50felt)	25-250 per synsfelt	7-60 per synsfelt	2+
>10 per synsfelt (minst 20 felt)	>250 per synsfelt	>60 per synsfelt	3+

Stop TB

ZN Antall syrefaste staver	IF (20 x forstørrelse) Antall syrefaste staver	IF (40 x forstørrelse) Antall syrefaste staver	
1-9 per 100 synsfelt	1-29 per lengde	1-19 per lengde	Sparsomt, angiantall
10-99 per 100 synsfelt	30-299 per lengde	2-199 per lengde	1+
1-10 per synsfelt (minst 50felt)	10-100 per synsfelt	5-50 per synsfelt	2+
>10 per synsfelt (minst 20 felt)	>100 per synsfelt	>50 per synsfelt	3+

ECDC

## Hvordan kvantitere

### Forslag til konklusjon:

Strategimøtet beslutter å følge de europeiske anbefalingene. Det er en fordel at kvantiteringen er standardisert, både for sammenligning laboratorier imellom, og ved deltakelse i europeiske kvalitetskontroller.

## Resultatrapportering

### Forslag til konklusjon:

Funnet bør kvantiteres og antall syrefaste staver per synsfelt bør angis.

## Hvilke prøvematerialer bør mikroskoperes

- Luftveismateriale skal alltid mikroskoperes, kanskje også sterile kroppsvæsker og vev.
- Verdien av å mikroskopere gastrisk aspirat, pleuravæske og urin er omdiskutert.
  - Clinical Microbiology Procedures
- Ikke anbefalt å mikroskopere blodige prøvematerialer pga lav sensitivitet. Mikroskopi av urin anbefales ikke pga apatogene syrefaste organismer som koloniserer urogenitaltraktus.
  - ECDC

## Hvilke prøvematerialer bør mikroskoperes

### Forslag til konklusjon:

Strategimøtet anbefaler at luftveismateriale fra pasienter med mistanke om smittsom lungetuberkulose mikroskoperes. Urinprøver bør ikke mikroskoperes. Mikroskopi av sterile kroppsvæsker og vevsprøver er lite sensitivt, men bør vurderes hos pasienter med sterk mistanke om mykobakterieinfeksjon.

(Anbefalingen gjelder for laboratorier som benytter mikroskopi som primærmetode for direktepåvisning)



## Isolering

- Tuberkuloseveilederen: isolering kan oppheves dersom tre sputumprøver eller en BAL er negativ ved direkte mikroskopi (dersom det ikke er mistanke om multiresistent tuberkulose).
- WHO anbefaler at antallet sputumprøver reduseres til to. WHO skriver at grundig mikroskopi av to sputumprøver identifiserer 95-98% av mikroskopi-positive pasienter.
- ECDC skriver i sine anbefalinger at minst 2 prøver bør undersøkes.

## Isolering

### Forslag til konklusjon

Strategimøtet mener at tuberkulosekomiteen bør vurdere om nasjonale anbefalinger skal endres i tråd med anbefalingene fra WHO og ECDC. En eventuell anbefaling om at to prøver er tilstrekkelig forutsetter at prøvematerialet er av god nok kvalitet, og at laboratoriene gir tilbakemelding til sine rekvirenter om dette.

## Strategimøte i bakteriologi 2016 Mykobakteriediagnostikk

Heidi Syre  
Stavanger universitetssjukehus

## Nukleinsyre amplifikasjonstester (NAATs) direkte i prøvematerialet

### Hvilke prøvemateriale bør undersøkes rutinemessig ved NAATs og eventuelt hvor mange?

### Hvilke prøvemateriale bør undersøkes rutinemessig ved NAATs og eventuelt hvor mange?

- To ulike strategier avhengig av hvilken metode som brukes for primærdiagnostikk for hurtig påvisning av MTBC
  - Nukleinsyre amplifikasjonstest
  - Mikroskopisk undersøkelse

## Nukleinsyre amplifikasjonstester direkte i prøvematerialet

### Prøver fra nedre luftveier

Forslag til anbefalinger:

#### For laboratorier som primært bruker NAAT

- NAAT skal **rutinemessig utføres på 2 prøver** fra pasienter med symptomer på lunge-TB hvor diagnosen er mistenkt men ikke bekreftet, og hvor testresultatet vil føre til endring i behandling eller smitteverntiltak. Det bør gjøres **direkte mikroskopisk undersøkelse** på alle NAAT positive prøver for å vurdere smittsomhet.

#### For laboratorier som primært bruker mikroskopisk undersøkelse

- NAAT skal rutinemessig utføres på **minst 1 prøve** fra pasienter med mistenkt **multiresistent (MDR) – eller HIV assosiert lunge-TB**. Ved høy mistanke om lunge-TB hos disse pasientgruppene og negativt resultat i første prøve, bør det vurderes å analysere prøve nummer to.
- NAAT bør rutinemessig utføres på **1 mikroskopi positiv prøve** fra pasienter med symptomer på lunge-TB hvor diagnosen er mistenkt men ikke bekreftet, for å **uteelukke NTM-infeksjon**.
- Ved **3 mikroskopi negative prøver** men likevel høy mistanke om lunge-TB bør det vurderes å gjøre NAAT på **1 prøve** for å få en tidlig diagnose.

## Nukleinsyre amplifikasjonstester direkte i prøvematerialet

- Prøver fra nedre luftveier
  - WHO policy update 2013
    - Systematisk gjennomgang og metaanalyse av publikasjoner som har vurdert Xpert MTB/RIF
  - Nukleinsyre amplifikasjonstester
    - Nyttig diagnostisk verktøy
    - Høyere sensitivitet og spesifisitet sammenlignet med mikroskopisk undersøkelse
    - Høy sensitivitet på mikroskopi positive prøver sammenlignet med dyrkning
    - Raskere testresultat enn dyrkning
  - Teste kun de med en reell pretest sannsynlighet for TB
    - Lav pretest sannsynlighet gir lav positiv prediktiv verdi / økt risiko for falske positive

Prøvemateriale	Sensitivitet %	Spesifisitet %
Ekspektorat fra voksne, uavhengig av mikroskopifunn	85-89	96-99
Ekspektorat fra voksne, mikroskopi positive	96-98	97
Ekspektorat fra voksne, mikroskopi negative	66-73	94-99
Ekspektorat fra voksne, HIV positive	79-80	98
Ekspektorat fra barn	62-66	98
Gastrisk lavage fra barn	66	98
Spinalvæske	56-81	96-99
Lymfeknuteaspirat/vev	80-87	92-96
Pleuravæske	37-73	94-99
Gastrointestinale vevsprøver	86	98
Genitouretrale prøver	70-77	94-98

Tabell 1. Sensitivitet og spesifisitet til NAATs for ulike prøvematerialer med dyrkning som referansemetode (1-11).

Table 2. Overall Sensitivity and Specificity of the MTR/RFI Test, According to the Number of Tests per Patient, as Compared with Three Sensors and Four Cultures.

Site and No. of Tests	Sensitivity			Specificity
	All Culture-Positive	Sensor-Positive and Culture-Positive	Sensor-Negative and Culture-Positive	No Tuberculous
<b>Site</b>				
<b>Limbo, Peru</b>				
Correct — no./total no. (%)	209/211 (99.1)	199/199 (100)	10/12 (83.3)	102/102 (100)
95% CI	96.6–99.7	98.1–100.0	55.2–95.3	96.4–100.0
<b>Baku, Azerbaijan</b>				
Correct — no./total no. (%)	144/149 (96.6)	80/80 (100.0)	64/69 (92.8)	68/70 (97.1)
95% CI	92.4–98.6	95.4–100.0	84.1–96.9	90.2–99.2
<b>Cape Town, South Africa</b>				
Correct — no./total no. (%)	142/148 (95.9)	95/96 (99.0)	47/52 (90.4)	186/189 (98.4)
95% CI	91.4–98.1	94.3–99.8	79.4–95.8	95.4–99.5
<b>Durban, South Africa</b>				
Correct — no./total no. (%)	43/45 (95.6)	30/30 (100.0)	13/15 (86.7)	213/219 (97.3)
95% CI	83.2–98.8	88.6–100.0	62.1–96.3	94.2–98.7
<b>Mumbai, India</b>				
Correct — no./total no. (%)	185/188 (98.4)	182/182 (100.0)	23/26 (88.5)	35/36 (97.2)
95% CI	95.4–99.5	99.7–100.0	71.0–96.0	85.8–99.5
<b>No. of MTR/RFI tests</b>				
<b>3 Samples (2 pellet and 1 direct)</b>				
Correct — no./total no. (%)	231/241 (95.8)	164/167 (98.8)	157/174 (90.2)	604/616 (98.1)
95% CI	96.2–98.5	99.0–100.0	84.9–93.8	96.6–98.9
<b>2 Samples (1 pellet and 1 direct)</b>				
Correct — no./total no. (%)	142/148 (95.9)	1127/1134 (99.4)	296/348 (85.1)	1215/1232 (98.6)
95% CI	94.6–97.1	98.6–99.7	79.7–89.2	97.3–99.2
<b>1 Sample (direct)</b>				
Correct — no./total no. (%)	675/732 (92.2)	551/561 (98.2)	124/171 (72.5)	604/609 (99.2)
95% CI	90.0–93.9	96.8–99.0	65.4–78.7	98.1–99.6

Boehme et al. N Engl J Med 2010.

Nukleinsyre amplifikasjonstester direkte i prøvematerialet

**Ekstrapulmonale prøver**

Forslag til anbefalinger:

- Siden ekstrapulmonal TB ikke er smittsom og dagens NAATs ikke er godkjente for ekstrapulmonalt prøvemateriale, er det ikke et krav at ekstrapulmonale prøver rutinemessig blir undersøkt med NAAT. Hvorvidt det bør gjøres NAAT avhenger av flere faktorer, blant annet pretest sannsynlighet for TB, alvorlighetsgrad av symptomer og immunstatus.
- Det bør gjøres NAAT på spinalvæsker fra pasienter med mistenkt TB meningitt. Ved lite prøvemateriale bør NAAT prioriteres for en mikroskopi, men dyrkning bør tilstrebes.

Prøvemateriale	Sensitivitet %	Spesifisitet %
Ekspektorat fra voksne, uavhengig av mikroskopifunn	85-89	96-99
Ekspektorat fra voksne, mikroskopi positive	96-98	97
Ekspektorat fra voksne, mikroskopi negative	66-73	94-99
Ekspektorat fra voksne, HIV positive	79-80	98
Ekspektorat fra barn	62-66	98
Gastrisk lavage fra barn	66	98
Spinalvæske	56-81	96-99
Lymfeknuteaspirat/vev	80-87	92-96
Pleuravæske	37-73	94-99
Gastrointestinale vevsprøver	86	98
Genitouretrale prøver	70-77	94-98

Tabell 1. Sensitivitet og spesifisitet til NAATs for ulike prøvematerialer med dyrkning som referansemetode (1-11).

Nukleinsyre amplifikasjonstester direkte i prøvematerialet

**Prøver fra alle lokalisasjoner**

Forslag til anbefalinger:

- Det anbefales at negative analysevar i NAATs gir et forbehold i svar til rekvirent om at det ikke utelukker tilstedeværelse av MTBC i prøven.
- Prøven bør dyrkes selv om NAAT utføres. Dyrkning er referansemetode for påvisning av MTBC og nødvendig for resistenstesting og genotyping.
- Det anbefales at alle laboratorier som utfører dyrkning med tanke på mykobakterier også utfører NAAT for påvisning av MTBC.

Nukleinsyre amplifikasjonstester direkte i prøvematerialet

**Preparering av prøve for NAATs og sikkerhet i laboratoriet uten P3 fasiliteter**

Forslag til anbefalinger:

- Minimum sikkerhetstiltak ved preparering av kliniske prøver for NAATs er arbeid i sikkerhetsvotrekt i et laboratorium med minimumsnivå 2 fasiliteter forutsatt at sikkerhetsvotrekket er velfungerende og blir kontrollert regelmessig.
- Det enkelte laboratoriet må gjøre en egen risikovurdering av prosedyrene som utføres ved prepareringen, særlig med tanke på risiko for aerosoldannelse, og utføre sikkerhetstiltak som er tilpasset de enkelte prosedyrene.

WHO. Tuberculosis laboratory biosafety manual, 2012.  
 ECDC technical document, 2016.  
 CDC. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th edition, 2007.

### Nukleinsyre amplifikasjonstester direkte i prøvematerialet

Hvor mange prøver med negativt NAAT resultat skal til for å oppheve isolering av pasient med mistenkt lunge-TB?

Forslag til anbefaling:

- Det anbefales at avisolering kan vurderes hos pasienter med mistenkt men ikke påvist lunge-TB når 2 ekspektoratprøver eller 1 BAL er negativ i NAAT. Anbefalingen forutsetter at prøvene er av god kvalitet. Anbefalingen gjelder kun for avisolering av personer med mistenkt TB. For pasienter med påvist TB skal avgjørelsen om oppheving av smitteverntiltak baseres på resultat fra mikroskopisk undersøkelse.

### Nukleinsyre amplifikasjonstester direkte i prøvematerialet

Hvor mange prøver med negativt NAAT resultat skal til for å oppheve isolering av pasient med mistenkt lunge-TB?

- CDC 2015: Xpert MTB/RIF resultat fra 1 eller 2 ekspektoratprøver kan erstatte mikroskopiundersøkelse i 2 eller 3 prøver

Studie	Land	Antall pasienter/ mikroskopi positive	Sensitivitet for mikroskopi positive	Negativ prediktiv verdi
Campos 2008	USA	493 / 35	1 prøve: 100%	100%
Boehme 2010	Peru, Aserbajdsjan, Sør Afrika, India	1730 / 567	1 prøve: 98.2% 2 prøve: 99.4% 3 prøve: 99.8%	Ikke oppgitt
Chaisson 2014	USA	142 / 9	1 prøve: 100%	>99%
Lippincott 2014	USA	207 / 6	1 prøve: 100%	Ikke oppgitt
Leutkemeyer 2016	USA	638 / ikke oppgitt (88 dyrkning positive)	1 prøve: 96.7% 2 prøve: 100%	1 prøve: 99.7% 2 prøve: 100%

Table 3. Overall Sensitivity and Specificity of the MTB/RIF Test, According to the Number of Tests per Patient, as Compared with Three Smears and Four Cultures.\*

Site and No. of Tests	All Culture-Positive	Sensitivity		Specificity
		Smear-Positive and Culture-Positive	Smear-Negative and Culture-Positive	
<b>Site</b>				
Limbo, Peru				
Correct — no./total no. (%)	209/211 (99.1)	199/199 (100)	10/12 (83.3)	102/102 (100)
95% CI	96.4–99.7	98.1–100.0	55.2–95.3	96.4–100.0
Baku, Azerbaijan				
Correct — no./total no. (%)	144/149 (96.6)	80/80 (100.0)	64/69 (92.8)	68/70 (97.1)
95% CI	92.4–98.6	95.4–100.0	84.1–96.9	90.2–99.2
Cape Town, South Africa				
Correct — no./total no. (%)	142/148 (95.9)	95/96 (99.0)	47/52 (90.4)	186/189 (98.4)
95% CI	91.4–98.1	94.3–99.8	79.4–95.8	95.4–99.5
Durban, South Africa				
Correct — no./total no. (%)	43/45 (95.6)	30/30 (100.0)	13/15 (86.7)	213/219 (97.3)
95% CI	85.2–98.8	88.6–100.0	62.1–96.3	94.2–98.7
Mumbai, India				
Correct — no./total no. (%)	183/188 (98.4)	162/162 (100.0)	23/26 (88.5)	35/36 (97.2)
95% CI	95.4–99.5	99.7–100.0	71.0–96.0	85.8–99.5
<b>No. of MTB/RIF tests</b>				
3 Samples (2 pellet and 1 direct)				
Correct — no./total no. (%)	723/741 (97.6)	566/567 (99.8)	157/174 (90.2)	604/616 (98.1)
95% CI	96.2–98.5	99.0–100.0	84.9–93.8	96.6–98.9
2 Samples (1 pellet and 1 direct)				
Correct — no./total no. (%)	1423/1482 (96.0)	1127/1134 (99.4)	296/348 (85.1)	1215/1232 (98.6)
95% CI	94.6–97.1	98.6–99.7	79.7–89.2	97.5–99.2
1 Sample (direct)				
Correct — no./total no. (%)	675/732 (92.2)	551/561 (98.2)	124/171 (72.5)	604/609 (99.2)
95% CI	90.0–93.9	96.8–99.0	65.4–78.7	98.1–99.6

Boehme et al. *N Engl J Med* 2010.

### Nukleinsyre amplifikasjonstester direkte i prøvematerialet

Bør svarbrevet til rekvirent ha kommentar om at positiv resultat i NAATs må bekrefte med dyrkning?

Forslag til anbefaling:

- Ved MTBC påvist direkte i prøvematerialet ved NAATs er det ikke nødvendig at svarbrevet til rekvirent kommenteres. Anbefalingen forutsetter at kun prøver fra pasienter med reell mistanke om TB testes. Det anbefales at positive resultat i NAATs meldes MSIS.

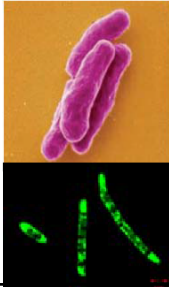
### Nukleinsyre amplifikasjonstester direkte i prøvematerialet

Bør NTM påvises direkte i prøvematerialet ved hjelp av NAAT?

Forslag til anbefaling:

- Det anbefales ikke rutinemessig påvisning av NTM direkte i prøvematerialet ved hjelp av NAAT.
  - Ikke smittsomt
  - Kommersiell direkte tester ikke godt nok utprøvd

## Dyrkning av mykobakterier



Irena Szpinda  
Tone Tønjum  
Avdeling for mikrobiologi



## Årsaken til TB

### *Mycobacterium tuberculosis*: Medlem av Mtb-komplekset



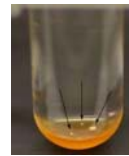
- Ikke-bevegelig og ikke-sporulerende staver (1-10 µm i lengde, 0.2-0.6 µm i bredde)
- Aerobe bakterier
- Deler seg hver 16-20 time (svært langsomtvoksende)
- Klassifisert som Gram-positiv, men er vanskelig å farge pga svært høyt lipid- og mykolsyre-innhold i celleveggen
- Siden MTB beholder visse farger selv etter syrebehandling, kalles de **syrefaste bakterier**
- Cordfaktor: klumper seg sammen sideveis

## Forbehandling før dyrkning: Dekontaminasjon av prøver med normalflora

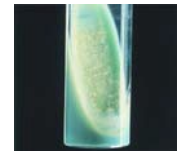
- Dekontaminasjon med NALC / 2%NaOH forbehandling → eliminering / reduksjon av normal- flora samt jevnere fordeling og konsentrasjon av mykobakterier. NB! ferske løsninger NALC/NaOH-løsninger.
- Forbehandling av prøver fra CF pasienter: Vekst av NTM hemmes av *Pseudomonas aeruginosa* som er til stede i luftveiene hos 80% av CF-pasienter; NALC / 4%NaOH, klorhexidin eller oxalsyre.
- I fæces er normalfloraen spesielt rik: Forbehandling NALC / 2%NaOH.
- C18-carboksypropylbetaine, cetylpyridinium-klorid, Na-karbonat/-borat.
- Forbehandling med laurylsulfat er faset ut, uforenlig med MGIT og PCR.

## Dyrkning av mykobakterier

Flytende medium  
Middlebrook



Fast medium  
Löwenstein-Jensen



## Dyrkningsmedier for mykobakterier

- **Flytende medier**
  - Middlebrook 7H9 broth
  - Dubos' medium
  - Proskauer and Beck's medium, Sula's medium, Sauton's medium
- **Faste medier**
  - **Egg-baserte** – Löwenstein-Jensen medium, Petraghani medium & Dorset medium
- Middlebrook 7H10/7H11 agar
- Blood-baserte – Tarshis medium, serum-baserte – Loeffler medium, Potato-baserte – Pawlowsky medium

## Vanligste ikke-selektive medier

- Flytende medier: Middlebrook 7H9 broth
- Egg-based medier: Löwenstein-Jensen (LJ) medium og Ogawa medium
- Agar-baserte medier: Middlebrook 7H10 og Middlebrook 7H11



## Bruk av selektive medier

- Ved rik normalflora eller CF: sputum, abscess, BAL, ventrikkelvæske, urine, etc.
- Resistensbestemmelse

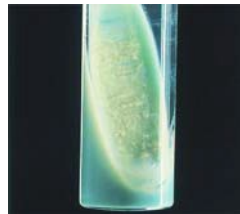
## Dyrkning av mykobakterier

Löwenstein-Jensen fast medium: eggeplommer m.m.

Høy kompleksitet  
Deteksjon ved visuell inspeksjon

BACTEC MGIT 960 semi-automatisert dyrknings av mykobakterier i flytende medium

Deteksjon av fluorescens ved oksygenreduksjon/forbruk



## Kommersielt tilgjengelige semi-automatiserte systemene for hurtig påvisning av mykobakterier i flytende medium

- BACTEC MGIT 960 system (Becton Dickinson and Company Diagnostic Systems)
- ESP Culture System II (Trek Diagnostic Systems)
- MB/BacT (bioMérieux)

## Prøver som bør dyrkes parallelt på både flytende og faste medier

- Benmarg
- Blodkulturer
- Spinalvæske
- Biopsier
- Andre viktige, sterile materialer
- Dyrkes i tillegg på Löwenstein-Jensen med glycerol (fremmer vekst av *M. ulcerans*): luftveisprøver fra CF-pasienter
- Dyrkes i tillegg på Löwenstein-Jensen med pyruvat: når mistanke om *M. bovis*

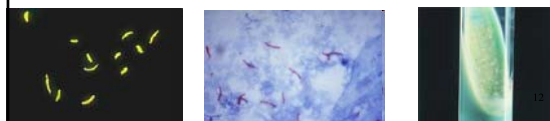
## Dyrkning av mykobakterier Anbefalinger

- Alle prøver som undersøkes med hensyn på mykobakterier bør dyrkes i flytende medium, ifølge internasjonale retningslinjer fra WHO og CDC
- Bredt utvalgte prøver dyrkes parallelt på både flytende medium og faste medium (Middlebrook 7H10 eller LJ-G) og ved ulike temperaturer: benmarg, blodkulturer, spinalvæske, biopsier og andre viktige, sterile materialer
- ECDC anbefaler i 2016 at alle mykobakterieprøver dyrkes parallelt på både flytende og faste medier
- De fleste rapporter støtter dette, særlig gammel litteratur, mens nyere rapporter får stadig bedre resultater med flytende medium vs LJ.
- SSI dyrker blod kun i flytende medier

## Den diagnostiske utfordringen

Jern og andre tilsetninger

- Mål: Høy sensitivitet og spesifisitet i ved dyrkning!
- Spesielt kravfulle NTM : *M. haemophilum* (jern), *M. genavense*, *M. avium subspecies paratuberculosis* (Fe/mycobactin J)



## Den diagnostiske utfordringen

### Temperatur

- Prøver som dyrkes ved lavere temperatur 15–32 °C: hud, sår, overfladiske strukturer
- Sikre at finner NTM med lavere temperatur-optimum

## Andre NTM med spesielle behov

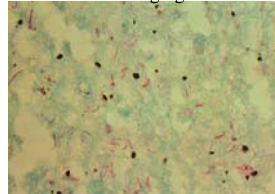
- *M. bohemicum*
- *M. haemophilum*
- *M. interjectum*
- *M. lentiflavum*
  
- Økende: *M. abscessus*

## Dyrkningstid

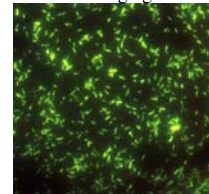
- Minimum 6 ukers inkubasjon i flytendemedium
- Faste medier inkuberes i 8 uker (12 uker for utvalgte prøver) før de kan beskrives som negative
- Gaby Pfyffer JCM 2016: «A final report cansafely be issued by the clinical mycobacteriology laboratory utilizing the Bactec MGIT 960 system **after 4 weeks**, stating that (i) thed for another 4 weeks, and (iii) only in the case of positivity an additional report will be generated by the laboratory.»

## Mikroskopi ved positiv vekst, evt. PCR

Ziehl-Neelsen farging



Auramin-farging



Cord factor



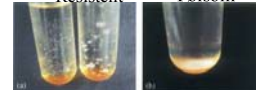
## Mycobacterium tuberculosis-komplekset Resistensbestemmelse ved dyrkning

Førstelinje-medikamenter:  
Rifampicin høy/lav, isoniazid høy/lav,  
pyrazinamid, etambutol (streptomycin)  
– testes i TB rutinelab

Andrelinje-medikamenter:  
Fluoroquinoloner, capreomycin, kanamycin, amikacin,  
.. Bedaquiline.. – testes TB referanselab FHI

## Mycobacterium tuberculosis resistensbestemmelse

Flytende medium  
Resistent Følsom

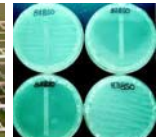


Fast medium

Skåler med ulik mengde antibiotika

LJ med antibiotika

MIC-bestemmelse med Etest





All antibiotikaresistens hos mykobakterier skyldes mutasjoner i kromosomale gener




Genom instabilitet:  
betydning for evolusjon, antigen variasjon/immun-evasjon og antibiotikaresistens  
→  
kan påvirke fitness og hvor godt isolatet vokser

### Stopp TB



### MPT64 antigen assay for identification of the *M. tuberculosis* complex

Harleen Grewal, prof. dr.med.  
Mikrobiologisk afdeling  
Haukeland Universitetssykehus




MPT64 (Rv1980c), a 24-kDa protein of *M. tuberculosis* (MTB), is an important secreted protein

MPT64 antigen is only present in the MTB complex; subsequent discrimination from nontuberculous mycobacteria (NTM) is possible

Most substrains of *M. bovis* BCG do not express the MPT64 antigen

It is only expressed and secreted from actively growing cells

Exact role unclear but probably functions as a virulence factor by inhibiting apoptosis of macrophages (through the NF- $\kappa$ B-mRNA21-BC-2 Pathway)



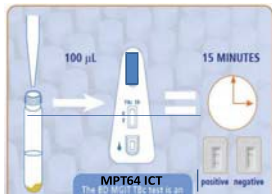
Tertiary structure of the MPT64 protein as predicted by PyMol software.

Yi Jiang et al., J. Clin. Microbiol. 2013;51:1558-1562

### Commercial MPT64-based tests for rapid identification of the *M. tuberculosis* complex

Commercial MPT64-based immunochromatographic tests (ICTs):

- Capilia TB assay (TAUNS, Numazu, Japan)
- SD Bioline AgMPT64 rapid assay (StandardDiagnostics, South Korea)
- BDMGIT TBc ID test (Becton Dickinson, Sparks, USA)\*
- TBCheck MPT64 (HANA Labscience, Germany)\*



\*Liquid cultures recommended

### Meta-Analysis of MPT64 Assays for Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Liquid Culture

Overall diagnostic performance of each MPT64 ICT assay

Commercial MPT64 ICT assay	All samples		Clinical specimens only <sup>a</sup>			
	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV <sup>b</sup> (95% CI)	NPV <sup>b</sup> (95% CI)
Capilia TB test	98.3 (97.6 to 98.9)	99.2 (98.5 to 99.7)	98.8 (98.1 to 99.3)	99.1 (98.3 to 99.6)	99.4 (98.9 to 99.8)	98.2 (97.1 to 98.9)
BIOLINE SD Ag MPT64 Rapid Test	98.6 (97.3 to 99.4)	100 (98.7 to 100) <sup>d</sup>	97.0 (93.6 to 98.9)	100 (91.4 to 100) <sup>d</sup>	100 (98.1 to 100) <sup>d</sup>	87.2 (74.3 to 95.2)
MGIT TBcID	98.1 (97.1 to 98.9)	99.6 (98.5 to 100)	97.9 (96.4 to 98.9)	99.5 (98.2 to 99.9)	99.7 (98.8 to 100)	96.8 (94.6 to 98.3)

All samples: include reference and archived specimens

Brent AJ et al. J. Clin. Microbiol. December 2011 vol. 49 no. 124343-4346

### Meta-analysis of published studies to evaluate the accuracy of commercial MPT64-based ICTs

- 28 studies were included: pooled estimates were 97% (confidence interval [CI] 96-97%) for sensitivity and 98% (CI 98-99%) for specificity
- The total number of strains analyzed in the meta-analysis was 6712
- 18 studies only used liquid media, 1 study only used solid media, and 9 used both solid and liquid media
- Subgroup analysis showed that test accuracy did not depend on the commercial kit, or type of medium
- Most studies had sensitivity of >95% and a specificity of >98% (one study had lower sensitivity (76%) and specificity (86%) → high proportion of contaminated MGIT cultures)
- Very few false positive results reported (*M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. gastri*, *S. aureus*)


Yin X et al; J of Infection, 67; 2013, 369–377; \*Chikamatsu et al; BMC Inf. Dis. 2014, 14: 54

### Sources of error:


A small minority of MTBC isolates are not detected by MPT64 assays:

- due to deletion or mutation of the *mpb64* gene
- region absent from some *M. bovis* BCG strains
- low MPT64 concentrations in early cultures
- contaminated MGIT cultures (an aliquot inoculated onto blood agar to detect contamination → defined as growth within 48 h of incubation at 37°C).

→ Combining an MPT64 ICT with observation of AFB cording and a NAAT performed with MPT64-negative isolates might further improve sensitivity



Ziehl-Neelsen stain, AFB Cord Formation from BACTEC MGIT960 medium




**Tbc BD MGIT ICT; MIA, Haukeland Universitetssykehus**

Result	2012	2013	2014	2015	2016	Total
Inconclusive			1	2		3
Negative	15	17	24	37	19	112
Positive	15	13	14	15	14	71
Total	30	30	39	54	33	186

**Positive result:**  
GenoType MTBC assays for the differentiation of MTB complex  
Resistance testing: GenoType MTBDRplus (Hain LifeScience)

**Negative result:**  
The presence of NTM is assumed and GenoTypeMycobacterium CM/AS (Hain LifeScience) is used for further differentiation





**Commercial MPT64 based tests for rapid identification of the *M. tuberculosis* complex**

**Disadvantages**

The method (i) cannot be applied directly to clinical samples; ii) requires further confirmatory tests for identification at species level.

**Advantages of MPT64 ICTs**

- **Rapid detection:** rapid detection of *M. tuberculosis* complex and consequent discrimination from NTM within 10 minutes.
- **Indication for further diagnostics:** Depending on the results, further differentiation of MTB complex or NTM differentiation are indicated.
- **Ease of use:** Just one single pipetting step is necessary
- **No instrumental costs:** No instrumentation is necessary for the assay
- **Meta-analysis of MPT64 ICT performance shows very high sensitivities and specificities for all commercial MPT64 assays,** where sufficient data available



**MPT64 antigen assay for identification of the *M. tuberculosis* complex**

**Conclusion and suggestion for a recommendation:**

Data provide strong support for the use of the MPT64 ICT as a rapid and reliable method for the identification of MTBC

A positive MPT64 ICT result together with appearance of cording in ZN staining is sufficient basis for an initial notification (but has to be followed by confirmation)

*ECDC: «should not replace the currently endorsed standard methods of detecting mycobacteria. Instead they should be used to support the diagnostic work up. Test results should always be confirmed using the standard methods.»*

## Identifisering av mykobakterier ved hjelp av MALDI TOF massespektrometri

André Ingebretsen  
Avd. for mikrobiologi og Avd. for smittevern  
Oslo universitetssykehus

## Noen viktige spørsmål man må stille seg selv

- Kan man identifisere mykobakterier ved hjelp av MALDI TOF MS?
- Hvor viktig er det for meg (og pasienten) å identifisere mykobakterier ved mitt laboratorium?
- Hvor mye ressurser er jeg villig til å investere for å identifisere mykobakterier ved hjelp av MALDI TOF MS?

## Identifikasjon av Mycobacterium sp.

- Konsensus-protokoll?
- Veksthastighet
- Inaktivering
- Artsvariasjon
- Ikke nok spektre i databasen
- Databasen er ikke bygd opp konsekvent

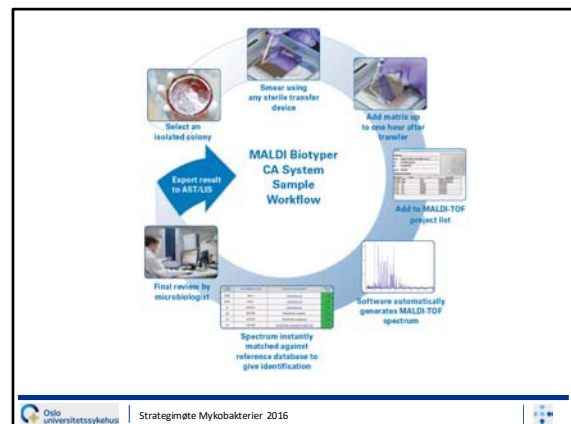


## Internasjonalt konsortium - mykobakterier



Wittwer et al.2013

Mars 2016: Mycobacteria library 4.0



## Flytskjema -prøvepreparering

- Varmeinaktivering
- Kjemisk inaktivering
- Mekanisk inaktivering
- Maursyre/Acetonitril
- Kuler
- Etanol vasking

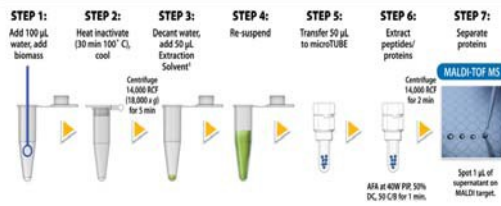
## Flytskjema -prøvepreparering



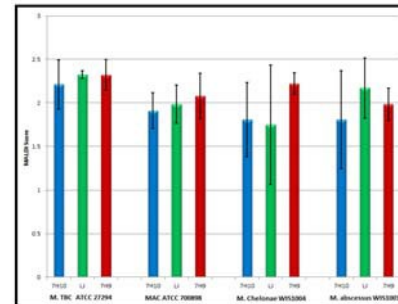
O'Connor et al. 2016 JCM

## Variasjoner over tema

### GROUPED

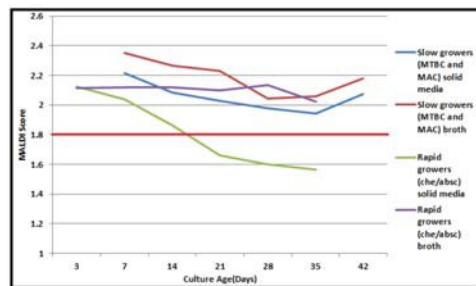


## Effekten av forskjellige kulturmedier på MALDI score



Busalacchi et al. Wisconsin State Laboratory of Hygiene. Poster 2015

## Effekten av kulturalder på MALDI score



Busalacchi et al. Wisconsin State Laboratory of Hygiene. Poster 2015

## Mykobakterier som er vanskelige å identifisere (Bruker)

### Similar species (log(score) value is $\geq 2.1$ )

- *M. chubuense*, *M. chlorophenolicum* and *M. psychrotolerans*
- *M. crocinum* and *M. pallens*
- *M. fortuitum* complex members especially *M. farcinogenes*, *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*, *M. porcinum* and *M. senegalense*
- *M. gadium* and *M. tusciae*
- *M. sherrisi* and *M. simiae*

### Very similar species (log(score) value is $\geq 2.3$ )

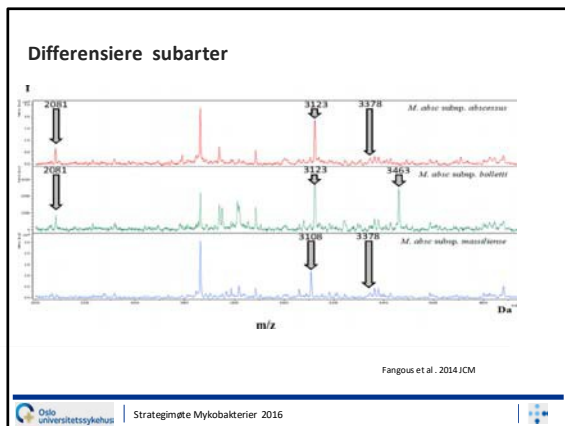
- *M. austroafricanum* and *M. vanbaalenii*
- *M. canariense* and *M. cosmeticum*
- *M. murale* and *M. tokaiense*

### Combined to a group/complex (log(score) value is $\geq 2.45$ )

- *M. intracellulare* and *M. chimaera*
- *M. mucogenicum* and *M. phocaicum*
- *M. tuberculosis* complex members

Bruker Daltonics





- ### Problemer med flytende medium (MGIT)
- Ikke nok celler til MALDI ID når MGIT rørene flagger ut.
    - LOD MALDI er  $10^7 - 10^8$  celler
    - LOD MGIT er  $10^5 - 10^6$
  - Forstyrrende substanser i MGIT som påvirker massespektre
    - Proteiner?
    - Pigmenter?
  - Miks av mikrober i MGIT
    - Mykobakterier som klumper segsammen?
- Oslo universitetssykehus | Strategimøte Mykobakterier 2016

- ### Nytt internasjonalt konsortium
- TASK 1: STANDARDIZATION OF AN EFFECTIVE IDENTIFICATION OF NTM FROM SOLID MEDIUM**
    - For this purpose, the first thing we decided to do is to send out our SOP or working protocol for ID of NTM from solid medium with detailed information of the changes we have introduced in our laboratories.
    - Evaluation of the different modified protocols, including the nomination step proposed by James O'Connor [O'Connor et al. JCM2016]
    - Developed a unified, standard SOP valid for all the groups. This new SOP will be our reference (standard) SOP for comparison studies.
  - TASK 2: STANDARDIZATION OF AN EFFECTIVE IDENTIFICATION OF NTM FROM FLUIDS**
    - Again, we can send out our SOP or working protocol for ID of NTM from solid medium with detailed information of the changes we have introduced in our laboratories.
    - Evaluation of the different modified or standard protocols. The procedure proposed by Arthur works fine in Arthur Patrick's laboratory in Dortmund.
    - Developed a unified, standard SOP valid for all the groups. This new SOP will be our reference (standard) SOP for comparison studies.
  - TASK 3: INOCULATION TEST**
    - The idea is to get more information about how good our goal is the performance of MALDI for different NTM species in MGITs. Different concentration of NTM species to show growth and a rapid growth to start with) will be tested in order to know the LOD for different species and if special conditions are required.
- 18 laboratorier fra
    - Spania
    - Belgia
    - Tyskland
    - Sveits
    - Tsjekkia
    - Irland
    - Storbritannia
    - Østerrike
    - Nederland
    - Frankrike
    - Norge
- Oslo universitetssykehus | Strategimøte Mykobakterier 2016



## Identifikasjon av mykobakterier med molekylære metoder

Dr scient Mona Holberg-Petersen  
Avdeling for mikrobiologi  
Oslo universitetssykehus

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## Identifikasjon av mykobakterier

- Beskrevet 175 arter og 13 subspecies
  - En oversikt over beskrevne mykobakteriearter: <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>
- Identifikasjon til arts- eller kompleksnivå viktig for å:
  - Skille patogene mykobakterier fra de som ikke gir sykdom
  - Gi optimal behandling
- Genetisk identifikasjon raskere og mer presis enn fenotypisk
  - Genetisk identifikasjon har påvist mange nye mykobakteriearter

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## Mål-gen

- Krav til mål-gen:
  - må være tilstede i alle mykobakterier
  - må inneholde konserverte (broad-range PCR) og variable områder (arts- eller kompleks spesifikke)
- Mest brukt:
  - 16S rDNA, 23S rDNA, 16S – 23S ITS, hsp65, rpoB og gyrB (*M. tuberculosis* kompleks)
- Forskjell på hvor godt mål-genene skiller mellom artene

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## Genetisk identifikasjon av mykobakterier

- Hybridisering
- DNA sekvensering
  - Real time PCR
  - PCR og Restriksjonsfragment lengde polymorfisme (RFLP)
  - Pyrosekvensering
  - NGS (Neste-generasjons-sekvensering)
  - Microarray

Forskjell på hvor mange arter som kan identifiseres i én og samme reaksjon og hvor arbeids- og tidkrevende testen er

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## Kommersielle hybridiseringstester

- GenoType (Hain, Tyskland)
- INNO-LiPA (Innogenetics, Belgia)
- AccuProbe (Gen-Probe, San Diego)
- Speed-Oligo (Viracell, Spania)

Forskjeller mhp hvilket mål-gen testen bruker, hvor god den er til å skille mellom enkelte arter, og hvor mange arter den kan påvise i én og samme reaksjon.

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## Påvisning av MTBC og *M. leprae* med GenoType tester

- MTBC
  - Mål-gen: gyrB og tilstedeværelse eller fravær av RD1
  - Differensierer mellom artene i *M. tuberculosis* komplekset (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* og *M. pinnipedii*)
    - *M. tuberculosis* og *M. canettii* og *M. africanum* og *M. pinnipedii* kan ikke skilles
- LepraeDR
  - samtidig påvisning av *M. leprae* og resistens mot rifampicin, ofloxacin og dapsone

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## GenoType tester for identifikasjon av NTM

- **Mycobacterium CM** (Common Mycobacteria)
  - Påviser Mycobacterium genus, M. tuberculosis complex og 14 av de vanligste mykobakterieartene
- **Mycobacterium AS** (Additional Species)
  - Påviser 16 andre mykobakteriearter

**Mål-gen Mycobacterium CM og AS:** 23S rDNA

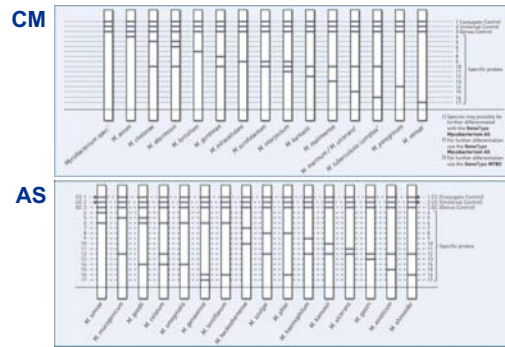
**Totaltid:** ca 6 timer

- **NTM-DR**
  - skiller *M. avium*, *M. intracellulare* og *M. chimaera* i MAC og *M. chelonae* og *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, og *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Testen kan også påvise antibiotikaresistens.

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## GenoType Mycobacterium CM og AS



## GenoType Mycobacterium CM

Mycobacterium sp	M. avium,
M. tub complex,	M. abscessus,
M. chelonae,	M. gordonae,
M. intracellulare,	M. scrofulaceum,
M. interjectum,	M. kansasii,
M. malmoense,	M. peregrinum,
M. xenopi,	M. marinum/
M. fortuitum,	M. ulcerans

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## GenoType Mycobacterium AS

M. simiae,	M. mucogenicum,
M. goodii,	M. celatum,
M. smegmatis,	M. genavense,
M. lentiflavum,	M. heckeshornense,
M. haemophilum,	M. kansasii,
M. ulcerans,	M. gastri,
M. asiaticum,	M. shimoidei
M. phlei,	M. szulgai/M. intermedium

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## INNO-LiPA Mycobacteria v2

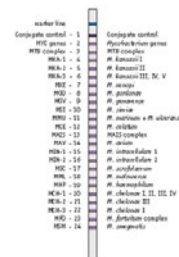
- **Mål-gen:** 16S-23S Internal Transcribed Spacer (ITS)
- **Total tid:** ca 6 timer
- **Påviser:** *Mycobacterium* genus og 16 mykobakteriearter ellerkompleks:

M. tub complex,	M. kansasii,
MAIS complex,	M. fortuitum complex,
M. avium,	M. smegmatis
M. intracellulare,	M. xenopi,
M. scrofulaceum,	M. gordonae,
M. genavense,	M. simiae,
M. marinum/M. ulcerans,	M. celatum,
M. malmoense,	M. chelonae complex,
M. haemophilum	

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## INNO-LiPA Mycobacteria v2



## AccuProbe

- Mål-gen: 16S rRNA
- Total tid: 2 timer
- Påviser: Én mykobakterieart eller kompleks pr reaksjon
- 6 forskjellige kit:
  - *Mycobacterium tuberculosis* complex
  - *M. avium* complex
  - *M. avium*
  - *M. intracellulare*
  - *M. goodii*
  - *M. kansasii*

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## Sammenligning - Hybridiseringstester

	AccuProbe	INNO-LiPA	GenoType
<b>Mål-gen</b>	16S rRNA	16S-23S ITS	23S rDNA
<b>PCR</b>	-	+	+
<b>Hybridisering</b>	Løsning	Line-Probe	Line-Probe
<b>Arter eller kompleks/Kit</b>	1/6	16/1	(15+16)/2
<b>Totaltid (timer)</b>	2	6	6
<b>Utførelse</b>	Enkel	Noe mer krevende	Noe mer krevende
<b>Utstyr</b>	Sonikator + Luminometer	PCR + event. auto. hybridisering	PCR + Twincubator + event. auto. hybridisering

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## Hybridiseringstester - kryssreaksjon

- Noen av probene i hybridiseringstestene kryssreagerer med andre arter og feilidentifikasjon er beskrevet
- E. Tortoli et al, J Clin Microbiol 2010 sammenlignet Inno LiPA og GenoType for identifikasjon av 317 mykobakterieisolater og AccuProbe for 54 isolater:
  - Inno LiPA feilidentifiserte 20 og GenoType feilidentifiserte 28, de fleste kryssreagerer med *M. fortuitum* og *M. avium-intracellulare* probene. AccuProbe feilidentifiserte 9 av 54 arter, de fleste kryssreagerer med *M. avium* complex

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## Sekvensering

- Mål-genet 16S rDNA (hele ca 1.500 bp eller 500 første bp) regnes som gullstandard
  - Enkelte arter har lik 16S rRNA gen-sekvens
- Alternative mål-gen:
  - hsp65 (hele ca 4.400 bp eller 400 bp)
  - rpoB (hele ca 3.600 bp)
    - Langsomtvoksende NTM: 306 bp (posisjon 1362-1668) eller 360 bp (posisjon 902-1261)
    - Hurtigvoksende NTM: 760 bp (posisjon 2573-3337)
- Kan påvise de fleste mykobakterie-arter i én reaksjon
- Total tid: ca 1,5 døgn

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## Et område av 16S rDNA for forskjellige mykobakteriearter

```

M. tub. complex: GATAGG-ACCACGGGATGCATG--TCT-TGTGGTGGAAAGCGCTT--A
M. kansasii/gastri: .....TT.GC.....-C...-.....-T
M. avium/paratub: .....T.AA..C......C.....-T
M. intracellulare: .....TTTA.GC......TA.....-T
M. scrofulaceum: .....TT.GC.....-C.....-T
M. simiae: .....TT.GC.....-C.....-T
M. malmoense: A.....C..A.GC.....-C.....G.....-T
M. szulgai: .....C..A.GC.....-C.....G.....-T
M. xenopi: .....TTCTGC......GG-G......GGT..-T
M. marinum/ulcerans: .....T.....T.....C.....-T
M. terrae: .....T.....T.....T.....-T
M. chelonae/abec: A...T...G...CAC.T.C..G...G...-T
M. fortuitum: A...T...C.C.C.T...G...G...-T
    
```

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## NTM-arter som ikke kan skilles med 16S rDNA

16S rDNA 500 bp	Geno Type (23S rDNA)	Inno LiPA (16S – 23S ITS)	Alternativt gen
M. chelonae, M. abscessus, M. bolletii, M. massiliense	M. chelonae M. abscessus	M. chelonae kompleks	hsp65 og rpoB
M. marinum, M. ulcerans	M. marinum M. ulcerans	M. marinum, M. ulcerans	hsp65 eller rpoB
M. kansasii, M. gastri	M. kansasii M. gastri	M. kansasii	hsp65 eller rpoB
M. chimaera (skilles fra M. intracellulare i pos 403)	M. intracellulare	M. chimaera	hsp65 eller rpoB
M. peregrinum, M. septicum	M. peregrinum, M. septicum, M. alvei	M. fortuitum kompleks	hsp65 eller rpoB

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## Sekvensering - databaser

- Likhet med sekvenser i databaser danner grunnlag for identifikasjon
- Alle publiserte sekvenser er fritt tilgjengelig i GenBank <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
  - Viktig å kritisk vurdere søkene fordi sekvenser kan være dårlig validert, sekvensen som kommer ut med høyest score er ikke nødvendigvis den riktige, og enkelte isolater kan ha blitt feil-identifisert
- Alternative databaser:
  - EZTaxon <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>
  - <http://www.microbiology.hku.hk/16SpathDB/main.php>
  - <http://hsp65blast.phsa.ca/blast/blast.html>
  - RipSeq (Isentio, CA)

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## Sekvensering – algoritme for besvaring

- Det er ingen etablert algoritme for besvarelse av sekvenseringsbasert identifikasjon av mykobakterier
- For analyse av de 500 første basene i 16S rDNA anbefaler CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute):
  - Isolater med 100% likhet med sekvensen til én art besvares med artsnavn
  - Isolater med 99 – 99,9% likhet besvares med *Mycobacterium* sp, mest lik [artsnavn]
  - Isolater med mellom 99 og 95% likhet besvares med nærmest beslektet med *Mycobacteria* sp

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## Forslag til anbefalinger

- Identifikasjon med molekylærbiologiske metoder kan utføres fra flytende kultur eller faste medier. Det er imidlertid anbefalt at resultatene bekreftes med fenotypiske trekk
- For de fleste mykobakterielaboratorier vil en hybridiseringstest være godt egnet
- Ønsker man en mer presis identifikasjon og ved påvisning av nye arter bør man sekvensere ett, eventuelt flere gen

Strategimøte mykobakteriediagnostikk, 26. oktober 2016



## Resistensbestemmelse av mykobakterier

Strategimøte 26. oktober  
Anne Torunn Mengshoel  
Overlege  
Avdeling for tuberkulose, blod og seksuell smitte  
Referanselaboratoriet FHI

## Hvorfor

- Gi effektivbehandling
- Resistent TB er et globalt problem
- De fleste tilfeller i Norge er importert
- Overvåke resistens av TB
  - Registreres i MSIS fortløpende
  - Rapporteres årlig
    - NORM
    - ECDC
    - WHO

Resistensresultat MTBC (rapportert til NORM)

	2011	2012	2013	2014	2015
Antall meldte	362	378	401	327	318
Antall isolat	261	280	318	265	245
INH res % (n)	12.2 (32)	10.0 (28)	9.7 (31)	12.8 (34)	9.0 (22)
RIF res % (n)	1.5 (4)	2.9 (8)	2.2 (7)	3.8 (10)	2.4 (6)
ETB res % (n)	1.1 (3)	1.2 (3)	0.9 (3)	2.6 (7)	0 (0)
STR res % (n)	14.9 (39)	13.6 (38)	13.5 (43)	10.6 (28)	14.3 (35)
PZA res % (n)	6.1 (16)	3.9 (11)	4.4 (14)	7.2 (19)	4.9 (12)
MDR res % (n)	1.5 (4)	2.5 (7)	1.9 (6)	3.8 (10)	2.0 (5)

## Resistenstesting

- MTBC og NTM
- Fenotypisk og molekylært
- Ta utgangspunkt i dagens praksis

### Dagens praksis fenotypisk testing MTBC førstelinje medikamenter

- Becton Dickinson BACTEC MGIT 960 systemet med flytende Middelbrook medium (7H9) benyttes
- Kritiske konsentrasjoner i hht WHO2014
- Alle nye isolat testes for
  - Streptomycin, Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol, Pyrazinamid
- Utføres ved FHI og OUS både Rikshospitalet og Ullevål
  - Deltagelse i eksterne kvalitetskontroll program en forutsetning
- Påvist resistens repeteres ved FHI
  - hvis ikke det er påvist mutasjoner som er assosiert med resistens for det aktuelle medikamentet ved den kritiske konsentrasjonen som benyttes
- Kulturen sendes til FHI før resistensresultatene på primærlaboratorium er ferdig

### Dagens praksis fenotypisk testing MTBC andrelinje medikamenter

- Ved påvist MDR, polyresistens (to eller flere av førstelinje medikamentene) eller ved monoresistens for RIF eller INH
- Becton Dickinson BACTEC MGIT 960 systemet med flytende Middelbrook medium (7H9) til testingen med TB eXiST/EpiCenter programvare benyttes
- Kritiske konsentrasjoner i hht WHO2014
- Testes rutinemessig
  - Amikacin, Capreomycin, Prothionamid, Moxifloxacin, Linezolid
- Testes ved behov
  - Kanamycin, Ofloxacin, Rifabutin
- Utføres ved FHI
  - Deltagelse i eksterne kvalitetskontroll program en forutsetning
- Påvist resistens repeteres ved FHI
  - hvis ikke det er påvist mutasjoner som er assosiert med resistens for det aktuelle medikamentet ved den kritiske konsentrasjonen som benyttes

TABLE 3.3. DST methods and critical concentrations for first-line and second-line DST

DRUG GROUP*	DRUG	DST METHOD AVAILABLE	DST CRITICAL CONCENTRATIONS (µg/mL)			
			Löwenstein-Jensen <sup>†</sup>	Mittelman-HIU <sup>†</sup>	Wittetax-7H11 <sup>†</sup>	MGIT960
Group 1 First-line oral anti-TB agents	Isoniazid <sup>†</sup>	Solid, liquid	0.2	0.2	0.2	0.1
	Rifampicin	Solid, liquid	40.0	1.0	1.0	1.0
	Ethambutol <sup>†</sup>	Solid, liquid	2.0	5.0	7.5	5.0
	Pyrazinamide	Liquid	-	-	-	100.0
Group 2 Injectable anti-TB agents	Streptomycin <sup>†</sup>	Solid, liquid	4.0	2.0	2.0	1.0
	Kanamycin	Solid, liquid	90.0	5.0	6.0	2.5
	Amikacin	Solid, liquid	90.0	4.0	-	1.0
	Capreomycin	Solid, liquid	40.0	4.0	-	2.5
Group 3 Fluoroquinolones	Ofloxacin <sup>†</sup>	Solid, liquid	4	-	-	-
	Levofloxacin	Solid, liquid	-	1.0	-	1.5
	Moxifloxacin	Solid, liquid	-	0.5/ 1.0	-	0.5/2.0
	Gatifloxacin <sup>†</sup>	Solid	-	1.0	-	-
Group 4 Oral bacteriostatic second-line anti-TB agents	Etanercept	Solid, liquid	10.0	5.0	10.0	5.0
	Bedaquiline	Solid, liquid	10.0	-	-	2.5
	Cycloserine	Solid	30.0	-	-	-
	Para-aminosalicylic acid	Solid, liquid	1.0	2.0	8.0	4.0

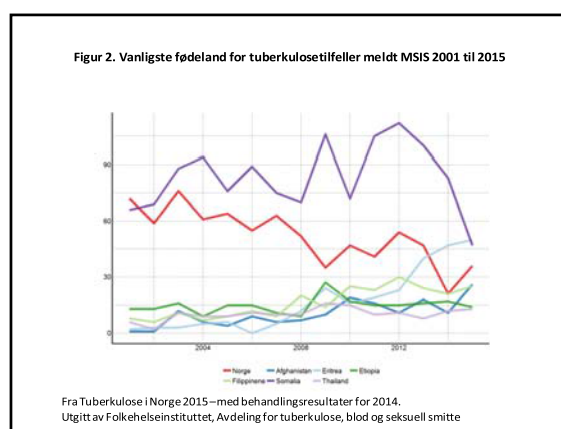
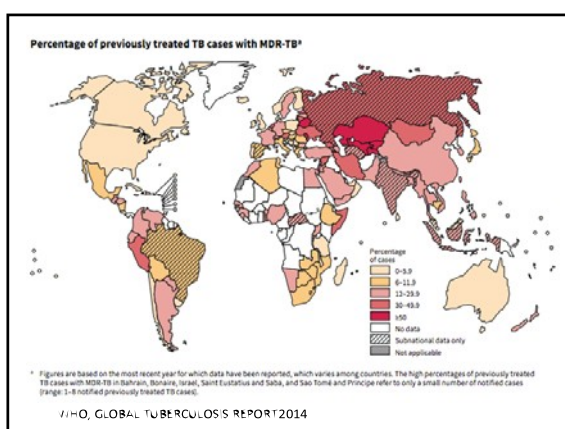
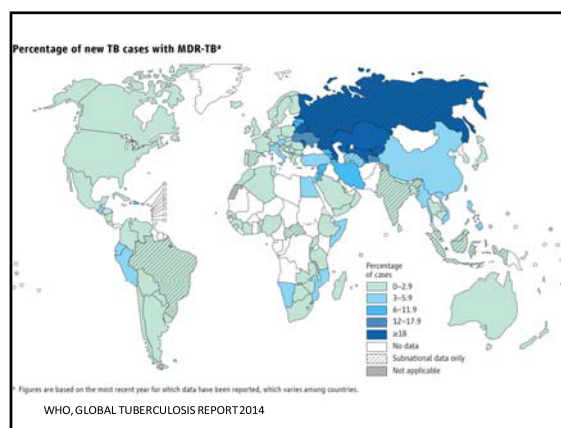
COMPANION HANDBOOK WHO 2014

**Anbefaling fenotypisk testing MTBC**

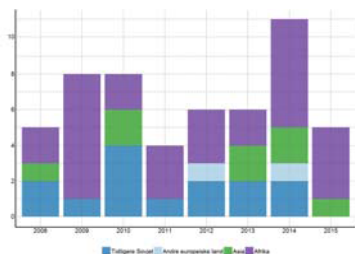
- Videreføre dagens praksis med unntak av
  - Ikke teste rutinemessig forstreptomycin

**Anbefaling for videresending og testing av MTBC isolat ved supranasjonalt referanselaboratorium (SNRL), Folkhälsomyndigheten, Sverige**

- Alle MDR og RIF resistente (RR) isolat videresendes til SNRL
- Tester rutinemessig for
  - cycloserin på LI for 30 mg/L
  - PAS(para-amino salicylsyre) på LI for 1 mg/L
- Tester ved behov for
  - Clofazimin i MGIT 960 ved 0.5 mg/L (event 1,0 og 2,0 mg/L)
- Tester under etablering
  - Delamanid i MGIT 960 ved 0.125 mg/L
  - Bedaquilin
- Før videresending av isolat til SNRL anbefales det å konferere med behandlende lege for å avklare hvilke medikament det er aktuelt å teste for



Figur 5. Antall multiresistente tuberkulose tilfeller meldt MSIS 2007 - 2015 etter fødested



Fra Tuberkulose i Norge 2015 – med behandlingsresultater for 2014. Utgitt av Folkehelseinstituttet, Avdeling for tuberkulose, blod og seksuell smitte

### Anbefaling genetisk testing MTBC for *rpoB* mutasjoner mtp MDR-TB

- Alle prøver med høy pre-test sannsynlighet for MDR-TB bør testes for *rpoB* mutasjon direkte i prøvematerialet og/eller i kultur
  - Pasient fra områder med høy forekomst av MDR-TB
  - Nærkontakter til kjente MDR-TB pasienter
  - Ved behandlingssvikt
- For påvisning direkte i prøvematerialet bør dette kunne gjøres innenfor helseregionen, eventuelt etter avtale med sykehus/laboratorium i annen helseregion
- Spesielt ved lav pretest sannsynlighet for MDR-TB bør påvist *rpoB* mutasjon direkte i prøvematerialet bekrefte ved retesting av ny prøve, samt bekrefte ved genetisk og fenotypisk testing av isolatet
- Ved uoverensstemmelse mellom fenotypisk og genetisk resistensresultat bør det gjøres sekvensering av *rpoB* gen, hvis det ikke er påvist spesifikk mutasjon ved LPA
- Spørsmål: Bør alle pasienter med smitteførende lunge TB (direkte mikroskopi positive) testes rutinemessig uavhengig av pre-test sannsynlighet for MDR-TB?

### Dagens praksis genetisk testing MTBC ved referanselab FHI

- Alle mottatte kulturer med mistanke om MDR, RIF eller INH resistent TB, testes med GenoType MTBDR<sub>plus</sub> for påvisning av mutasjoner i
  - *rpoB*
  - *katG*: høygradig INH resistens
  - *inhA*: lavgradig INH resistens og PTH resistens
- Alle mottatte kulturer hvor MDR eller RIF resistent TB er påvist, testes med GenoType MTBDR<sub>sl</sub>, for påvisning av mutasjoner
  - *gyrA* og *gyrB*: FLQ resistens
  - *rrs* og *eis*: SLID resistens

### GenoType MTBDR<sub>sl</sub>/og FLQ

- Resistensmutasjonene som påvises
  - høy grad korrelert til fenotypisk resistens for ofloxacin (OFX) og levofloxacin (LFX)
  - korrelasjonen til moxifloxacin (MXF) og levofloxacin (LFX) er usikker og fenotypisk resistensresultat vil best kunne avgjøre om disse medikamentene bør inkluderes i MDR-/RR-regime (WHO)
  - Behandling med FLQ bør generelt frarådes ved påvist D94mut i *gyrA* (Dominguez et al)

### Anbefaling genetisk testing MTBC ved referanselab FHI

- Videreføre dagens praksis for bruk av LPA
- Helgenomsekvensering er under etablering ved FHI
  - I fremtiden være metoden som benyttes for påvisning av mutasjoner som er assosiert med resistens
  - I kombinasjon med "simple-to-use web service" som for eksempel PhyResSe

### Anbefaling om rapportering av genetisk resistenstesting (Dominguez et al)

- Svarrapporten bør inneholde
  - informasjon om hvilke mutasjoner som er påvist
  - i hvilken grad den aktuelle mutasjonen er assosiert med resistens for det aktuelle medikamentet
  - ved fravær av mutasjoner bør det fremgå av svarrapporten at dette eventuelt ikke utelukker resistens for det aktuelle medikamentet
  - Europeisk nettverk for referanselab arbeider med retningslinjer
- Spørsmål: hvordan bør det rapporteres når det er påvist en *rpoB* mutasjon ved de testene som ikke sier noe om hvilken mutasjon som er påvist?

## Anbefaling for resistenstesting av NTM

American Thoracic Society Documents

### An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases

David E. Griffith, Timothy Akers, Barbara A. Brown-Elliott, Antonino Catanzaro, Charles Daley, Fred Gordis, Steven M. Holland, Robert Horsburgh, Gwyn Huitt, Michael F. Iademaro, Michael J. Haman, Kenneth Olivier, Stephen Rupp, C. Fordham van Rens, Richard J. Wallace, Jr., and Kevin Wirthrop, on behalf of the ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee

THIS OFFICIAL STATEMENT OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY (ATS) AND THE INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA (IDSA) WAS ADOPTED BY THE ATS BOARD OF DIRECTORS, SEPTEMBER 2006, AND BY THE IDSA BOARD OF DIRECTORS, JANUARY 2007.

### Antimicrobial Susceptibility Testing, Drug Resistance Mechanisms, and Therapy of Infections with Nontuberculous Mycobacteria

Barbara A. Brown-Elliott, Kevin A. Nash and Richard J. Wallace Jr  
Clin. Microbiol. Rev. 2012, 25(3):545. DOI: 10.1128/CMR.05030-11.

## Anbefaling for resistenstesting av NTM

- **Klinisk relevante** NTM isolat **kan** være aktuelle å resistensbestemme
- Bør utføres med buljong mikrofortynnings-metoden i hht
  - **CLSI standard M24-A2 Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes**; Approved Standard-Second Edition. March 2011.

## Testing i hht CLSI standarden

- ***M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* (RGM):**
  - rutinemessig testing med flere midler
- **MAC:** rutinemessig **clarithromycin**
- ***M. kansasii*:** rutinemessig **rifampicin**
- Andre NTM: ingen dokumenterte anbefalinger


## Resistenstesting av NTM ved FHI

- **Dagens praksis**
  - Utfører fenotypisk testing av hurtigvoksende i hht CLSI standard
  - Videre sender langsomtvoksende til Karolinska ved behov som også tester fenotypisk i hht CLSI standard
- **I tillegg anbefale**
  - Etablere fenotypisk testing for langsomtvoksende i hht CLSI standard
  - Etablere genetisk påvisning av resistens for hurtigvoksende spesielt med tanke på mtp makrolidresistens




Vegard Eldholm

**Molekylærepidemiologiske undersøkelser av MTBC**




**Molekylærepidemiologiske metoder**

- **Sannsynliggjøre eller avkrefte** transmisjonslinker mellom TB pasienter.
- Avdekke krysskontaminasjon i laboratoriet
- Skille reinfeksjon fra reaktivering



**Molekylærepidemiologiske metoder**

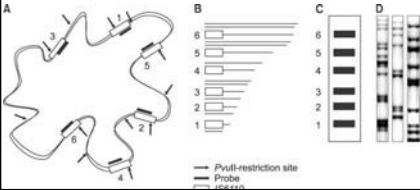
- Metoder varierer mht utstyrsbehov, hurtighet ++
- Ulike genetiske markører evoluerer ulikt



**Metoder: historikk**

~1990-2005: **RFLP**

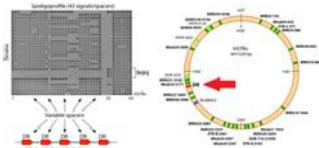
+	-
OK oppløsning	Tidkrevende
	Krever mye DNA av god kvalitet
	«gruppering», tolkning, deling



**Metoder: historikk**

~1995-i dag: **Spoligotyping**

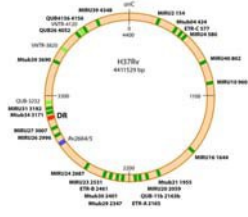
+	-
Stabile mønstre	Stabile mønstre
Raskt & enkelt (PCR)	Dårlig oppløsning
Databaser	«homoplasier»

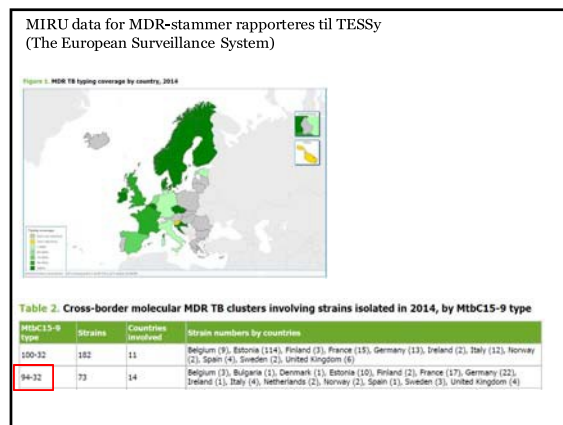
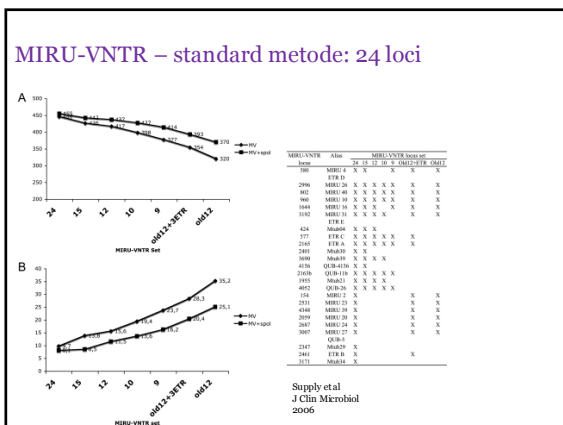


**MIRU-VNTR (fra 2005)**

Ruinemetode på **FHI** + store deler av **Europa** + verden

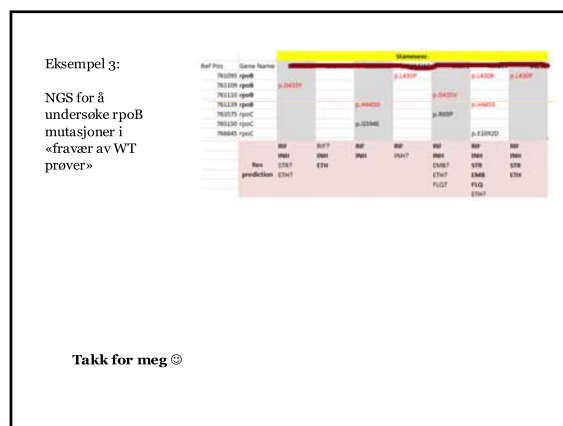
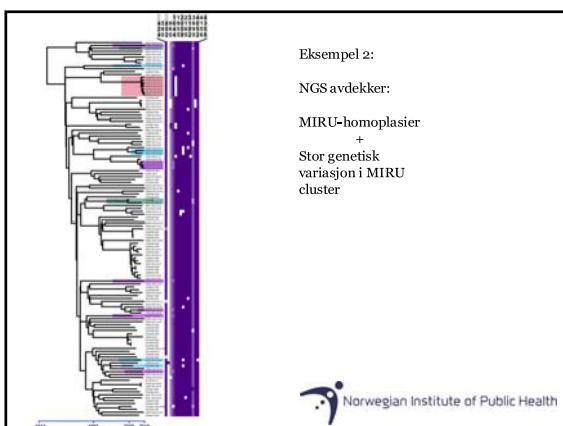
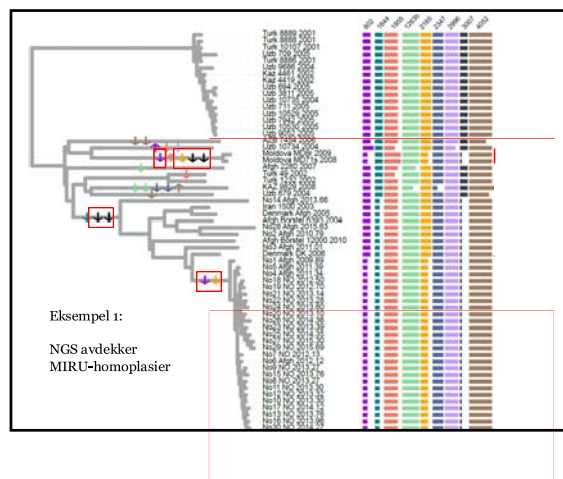
+	-
Raskt (PCR)	Krever kapillær elektroforese (HT)
OK+ oppløsning	Homoplasier
Deling & Database	Ikke bra for gruppering i familie/lineage





### Neste-generasjon sekvensering (NGS)

- Alle *Mtb* stammer sekvenseres ved FHI, men foreløpig ikke i «real-time»
- Rutine-workflow under etablering
- Verdifullt for utbruddsovervåking + detaljert info om resistensmutasjoner





**IGRA**

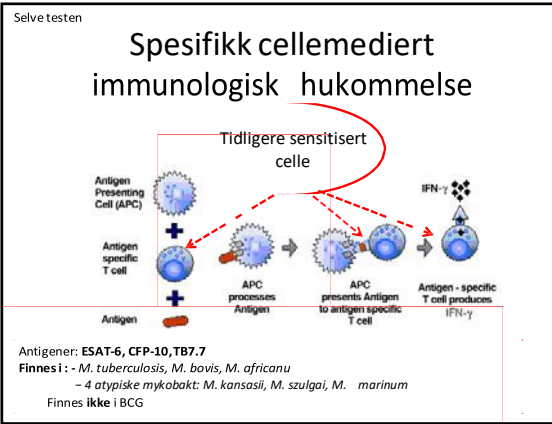
Anne-Marte Bakken Kran  
Mikrobiologisk avd OUS  
Ullevål

## Disposisjon

- Tekniske aspekter
  - Selve testen
  - Testvariabilitet
  - Cutoff og gråsoner
  - Rapportering av resultater
- Kliniske aspekter
  - Indikasjoner
  - Klinisk betydning og nytteverdi

Selve testen

## Spesifikk cellemediert immunologisk hukommelse



Antigen Presenting Cell (APC)

Antigen specific T cell

Antigen

APC processes Antigen

APC presents Antigen to antigen specific T cell

Antigen - specific T cell produces IFN- $\gamma$

Tidligere sensitisert celle

Antigener: ESAT-6, CFP-10, TB7.7  
Finnes i: - *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanus*  
- 4 atypiske mykobakt: *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*  
Finnes ikke i BCG

Selve testen

## IGRA: Interferon- $\gamma$ release assay

- **T-SPOT. TB**
  - ELISPOT, måler antall IFN $\gamma$  produserende celler
- **QuantiFERON-Tb-Gold in tube**
  - ELISA, måler mengde IFN $\gamma$ . (Nil, TB $\gamma$ , Mitogen)
- **QuantiFERON-Tb-Gold-Plus**
  - ELISA, måler mengde IFN $\gamma$ . (Nil, TB $\gamma$ 1, TB $\gamma$ 2, Mitogen)
  - TB $\gamma$ 1: CD4+ respons, TB $\gamma$ 2: CD8+ respons

Selve testen

## Selve testen: Anbefaling

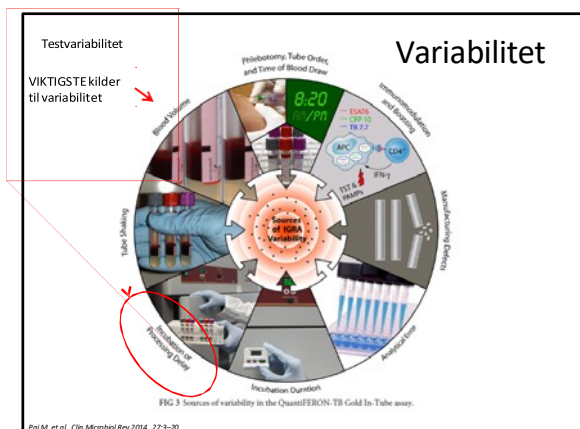
- Laboratoriene bør forberede overgang til **Quantiferon-TB-Gold Plus**
- Husk: IGRA er funksjonelle, immunologiske T celled-analyser
  - Quantiferon-testen er **ikke** en antistoffundersøkelse selv om serologiske metoder benyttes

Testvariabilitet

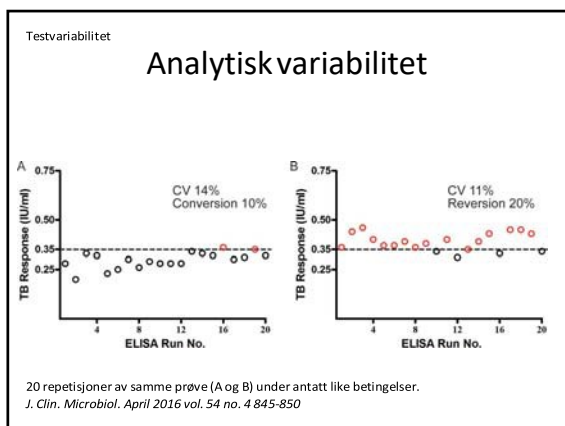
## Variabilitet

Funksjonelle assays – mange kilder til variabilitet

- Preanalytiske faktorer
- Analytiske faktorer
- Produksjonsfaktorer (manufacturing defects)
- Immunologiske faktorer
  - Biologisk variabilitet
  - Vertsfaktorer



- Testvariabilitet
- ### Preanalytiske faktorer
- Tidspunkt for prøvetaking (høyere IFNg kveld)
  - Inadekvat desinfeksjon
  - Rekkefølge av rør (nil, TBAg, mitogen)
  - Blodvolum
  - Shaking avrør
  - Tid til inkubering
  - Temperatur under prøvetransport
  - Varighet av inkubering
  - (Er prøven inkubert?)



- ### Biologiske/Immunologiske faktorer
- Tidspunkt for prøvetaking
  - Nylig TST
  - Microbe-associated molecular patterns (MAMPs)
    - feks LPS, peptidoglykaner, mikrobefragmenter
  - Heterofile antistoffer
- Vertsfaktorer:
- Aktuell infeksjon
  - Immunaktivering
  - Immunsuppresjon
- Vanskelig å skille mellom testvariabilitet og biologisk variabilitet

- Testvariabilitet
- ### Variabilitet oppsummering:
- Stor grad av variabilitet
  - Preanalytiske faktorer trolig viktigst:
    - Variasjon i blodvolum
    - Variasjon i tid før inkubering
  - Dette bør standardiseres mest mulig
  - Tilfeldig variasjon kan ikke unngås
  - **Kun praktisk betydning ved verdier omkring cutoff**
- Ofte vanskeligst for laboratoriet å kontrollere*

- ### Variabilitet: Anbefalinger
- Standardisere best mulig, men tilfeldig variasjon kan ikke unngås
  - Kun praktisk betydning ved verdier omkring cutoff
  - Spesiell oppfølging ved verdier omkring cutoff
    - Innføre gråsoner
    - Repetere
    - Kontrollprøve

Cutoff og gråsoner

## QFT: Tolkning av resultat

Fra pakningsvedlegget:

Interpretation	TB specific antigen response (IU/ml) <sup>a</sup>	Nil control (IU/ml)	Mitogen control (IU/ml) <sup>a</sup>
Positive	≥ 0.35 (and ≥ 25% of Nil)	< 8.0	any
Negative	< 0.35 OR > 0.35 and < 25% of Nil	< 8.0	≥ 0.5
Indeterminate	< 0.35 OR > 0.35 and < 25% of Nil	≥ 8.0	< 0.5
	any	> 8.0	any

Note: A low mitogen result, in conjunction with a negative TB result, is classified as an indeterminate result.  
<sup>a</sup>Corrected for Nil response.

Cutoff og gråsoner

## Cutoff og gråsoner

- Leverandør angir cutoff 0.35 IU/mL
- Stor variabilitet:
  - Skal 0.34 IU/mL eller 0.36 IU/mL skal avgjøre behandling av LTBI ???
- Gråsoner
  - Cutoff ± (2CV% x cutoff)
  - CV% defineres ut fra siste 30 målinger
- Forslag: TBAg-nil 0.25 IU/mL – 0.45 IU/mL
  - Felles gråsoner? Eller hver lab sin gråsoner?
    - TBAg-nil: 0.2 IU/mL -0.7 IU/mL i lavrisikopopulasjon (HCW)

PLoS One. 2014 Dec 26;9(12):e115322. doi: 10.1371/journal.pone.0115322. eCollection 2014. Occupational screening for tuberculosis and the use of a borderline zone for interpretation of the IGRAs in German health care workers.

Cutoff og gråsoner

## Hva med verdier omkring cutoff?

- Bør repeteres
- Bør kontrolleres (ny prøve etter 3-6 uker?)
- Hva med svake positive? (0.45 IU/mL – 1.0 IU/mL)
  - Klinisk betydning?
  - Hvordan bør de svares ut?
- Svake positive bør kontrolleres og evt repeteres for å avklare om de er reelt positive

Cutoff og gråsoner

## Reversering av svake positive

Baseline <sup>a</sup>	Reversions	Conversions
<0.01	-	5% (52/1129)
0.01 – 0.019	-	7% (65/972)
0.2 – 0.35	-	34% (21/62)
0.36 – 0.49	97% (28/29)	-
0.5 – 0.69	70% (16/23)	-
0.7 – 0.99	54% (7/13)	-
1.0 – 2.99	52% (12/23)	-
≥=3	13% (4/30)	-

<sup>a</sup> TB antigen minus Nil in IU/mL.

Ass. Prof. Susan Dorman, M.D. The Johns Hopkins University School of Medicine  
 doi:10.1371/journal.pone.0115322.g001

Studie av lavrisiko (helsepers.) (n=1094): Reversering hos 77% av de med TBAg-nil 0.35 – 1.16 IU/mL. TBAg-nil < 1.16 IU/ml viktigste prediktor for reversering.  
Thomasset al. Infection Control & Hospital Epidemiology, Volume 37, Issue 4, April 2016, pp. 478-482

Cutoff og gråsoner

## Cutoff og gråsoner: Anbefalinger

- Gråsoner og svake positive bør repeteres
- Gråsoner og svake positive bør kontrolleres, f.eks. etter 3-6 uker

Til diskusjon:

- Forslag til gråsoner: 0.25 IU/mL – 0.45 IU/mL
- Svak positiv, forslag til definisjon: 0.45 IU/mL – 1.0 IU/mL

Rapportering av resultater

## Rapportering av resultater

- Kvantitativt og kvalitativt
  - Verdi TBAg fratrukket Nil skal rapporteres (TBAg-nil)
  - Oppgis i IU/mL
  - Kvalitative svar: Pos, Neg, Grenseverdi, Inkonklusiv
- Kommentarer
  - Kommentarer bør ta høyde for usikkerhet i tolkning av resultatene, og understreke at resultatene alltid må sees i sammenheng med annen diagnostikk
  - Inkonklusive svar må alltid kommenteres

Rapportering av resultater

## Eksempler på kommentarer:

- **Grenseverdi:** Resultatet ligger nær cut-off for analysen. Resultatet må sees i sammenheng med smitterisiko, immunitetsstatus og resultat av annen diagnostikk. Metodens sensitivitet har vist seg variabel, særlig for enkelte pasientgrupper (f.eks. små barn og pasienter med immunsvikt). Ved reell mistanke om latent tuberkulose anbefales kontroll om 6-8 uker. Ved mistanke om aktiv tuberkulose sykdom anbefales innsending av egnet prøvemateriale til mikroskopi, dyrkning og resistensbestemmelse.
- **Positiv:** Analysen skiller ikke mellom latent og aktiv sykdom. Ved mistanke om aktiv tuberkulose sykdom anbefales innsending av egnet prøvemateriale til mikroskopi, dyrkning og resistensbestemmelse.
- **Negativ:** Resultatet må sees i sammenheng med smitterisiko, immunitetsstatus og resultat av annen diagnostikk. Metodens sensitivitet har vist seg variabel, og i enkelte pasientgrupper (f.eks. små barn og pasienter med immunsvikt) kan testen gi falskt negativt resultat i 20-30% av tilfellene til tross for infeksjon med M. tuberculosis-komplekset.

Rapportering av resultater

## Nil og Mitogen

- Høy verdi i Nil (men <8 IU/mL)
  - Høye nivåer av IFN $\gamma$  (infeksjon, inflammasjon etc)
  - Heterofile antistoffer
- Lav verdi i mitogen (men > 0.5 IU/mL)
  - Små barn
  - Immunsupprimerte
  - Inadekvat inkubering?

Kan gi økt usikkerhet i resultatet.  
Bør dette kommenteres?

Hvilken nytteverdi har negativ test hos små barn (<2-3 år)?

Forslag til kommentar ved negativt resultat og lav mitogen:  
Det påvises lav reaktivitet i positiv kontroll, noe som er vanlig hos personer med umodent immunsystem.  
Dette medfører økt usikkerhet i svaret.

Rapportering av resultater

## Nil og mitogen: Feilkilder

Lav mitogen:

- Få lymfocytter
- Redusert lymfocytaktivitet hos pasient (immunsvikt, små barn, medikamenter etc)
- Feilforbehandling av prøven
- Feil ved prøvetaking

Høy Nil:

- IFN- $\gamma$  i blodprøven (infeksjon, inflammasjon)
- Heterofile antistoffer
- Feilforbehandling av prøven
- Feil ved prøvetaking
- NB! Nil er bakgrunn. Skal alltid trekkes fra!

Mitogen: Unøyaktig mål på immunkompetanse.  
Mange feilkilder, ofte verdier utenfor analysens måleområde

Indikasjoner

## Indikasjoner for IGRA

- Diagnostikk av latent tuberkulose
  - Identifisere de som skal ha profylaktisk behandling
  - Avklare risiko for reaktivering
  - Som ledd i lovpålagt tuberkulose screening  
\*(forslag til endring av anbefalinger ute på høring nå)

Anbefaling: Kun ta IGRA av de man har intensjon om å gi forebyggende behandling ved positivt funn

- Som ledd i smitteoppsporing

- (Usikker nytteverdi ved utredning av aktiv TB. Anbefales ikke rutinemessig)

- Avklare positiv TST/Mantoux v/to-trinns modell
  - Der Mantoux er tatt på indikasjoner angitt ovenfor

Klinisk betydning og nytteverdi

## Klinisk betydning

- God negativ prediktiv verdi
- Variabel 'sensitivitet' (reduert T celle-respons)
  - Små barn
  - Immunsvikt, NB prednisolon, immunsuppr. behandling
  - Intensivpasienter
  - Aktiv TB
  - Ekstrapulmonal TB
- Ikke holdepunkt for at resultat av IGRA predikerer utvikling til aktiv TB
  - Nivå av IFN $\gamma$  har trolig liten prognostisk betydning
- Stor norsk registerstudie vil muligens gi flere svar

Klinisk betydning og nytteverdi

## Klinisk betydning: Anbefalinger

- Kun ta IGRA der der er intensjon om å gi forebyggende behandling ved positivt funn
- God negativ prediktiv verdi, men usikkerhet ved redusert T celle-funksjon
- Nivå av IFN- $\gamma$  har liten prognostisk verdi
- Høyere nivå av IFN- $\gamma$  tegn på reelt positivt resultat. Usikkerhet nær cutoff.

## Oppsummering

- Quantiferon-TB-Gold Plus kommer – Be prepared!
- Betydelig variabilitet: Preanalytiske faktorer trolig størst betydning
- Spesiell oppfølging ved verdier omkring cutoff
  - Gråsone, repetere analyse, kontrollprøve
- Utsvaring: Kvalitativt og kvantitativt
  - Resultatene må sees i sammenheng med klinikk, resultat av annen diagnostikk og total risiko.
- Indikasjoner: Hovedsakelig der man har intensjon om å gi forebyggende behandling ved positivt funn
- Nivå av IFN $\gamma$  liten prognostisk verdi, og predikerer ikke utvikling til aktiv TB

Utgitt av Folkehelseinstituttet  
Juli 2018  
Postboks 4404 Nydalen  
NO-0403 Oslo  
Telefon: 21 07 70 00  
Rapporten kan lastes ned gratis fra  
Folkehelseinstituttets nettsider [www.fhi.no](http://www.fhi.no)