

IDENTIFIKASJON AV GJÆRSOPP MED MALDI-TOF MS

Forfatter: Cecilie Torp Andersen

FORSLAG TIL ANBEFALINGER (**RØD** SKRIFT = TIL DISKUSJON KONTROVERSIELLE)

ANBEFALING 1 – MALDI-TOF MS SOM IDENTIFIKASJONSMETODE FOR GJÆRSOPP

- Identifikasjon av gjærsopp ved hjelp av MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight) massespektrometri kan i stor grad erstatte fenotypiske og biokjemiske identifikasjonssystemer for gjærsopp (1,2,3,4).
- Funnet bør også samsvare/korrelere med kolonititseende på kromogen agar, **og bør støttes av en annen identifikasjonsmetode (sekvensering) ved uventet eller svært uvanlig agens i klinisk viktige prøver.**

ANBEFALING 2 IDENTIFIKASJON AV INVASIVE ISOLAT

- Gjærsopp fra blod og sterile områder samt fra antatt invasiv infeksjon skal identifiseres til artsnivå med hjelp av massespektrometri.
- Ved tvil om artsidentifikasjon benyttes sekvensering (ITS, D1D2 eller annet egnet målgen), alternativt helgenomsekvensering for identifikasjon. (5,6)
- Isolatet sendes referanselaboratoriet som verifiserer/utfører endelig identifikasjon.
- Ved spørsmål om utbrudd med candida vil helgenomsekvensering bli aktuelt (metode valideres/OUS).
- Gjærsopp bør påvises massespektrometrisk direkte i positiv blodkultur på lik linje som bakterier, alternativt kan massespektrometri fra tidlig vekst på skål bidra til rask identifikasjon av aktuelt agens og eventuelt rettlede behov for alternativ behandling. (7,8,9)
- Det er lite resistens mot aktuelle soppmidler i Norge og korrekt og rask identifikasjon kan benyttes til rådgivning med tanke på valg av antimykotika til pasienter som ikke har stått på langvarig behandling eller profylakse.

ANBEFALING 3 IDENTIFIKASJON AV KOLONISERENDE FLORA

- Koloniserende flora bør identifiseres, men krav til sikker identifikasjon er her mindre, eksempel bare med bakgrunn i farge og morfologi på kromogen agar eller kun tilstedeværelse av utløpere på mediet som indikerer *C.albicans* (men ikke utelukker *C.dubliniensis*).
- *C.auris* må alltid identifiseres massespektrometrisk
- **MALDI-TOF MS bør alltid benyttes på gjærsopp fra inneliggende risikopasienter eksempelvis fra hematologen eller intensivavdeling hvor koloniserende flora kan være/bli utgangspunkt for invasiv infeksjon.**

ANBEFALING 4 BRUK AV KROMOGENE MEDIER OG ANDRE SPESIFIKKE MEDIER FOR PÅVISNING AV GJÆRSOPP I PRØVE OG SOM MEDIUM FOR IDENTIFIKASJON

- Sabouraud glukose/dextrose agar med kloramfenikol og gentamicin er en universal, selektiv soppskål som egner seg for dyrkning av gjærsopp og videre identifikasjon med MALDI-TOF MS

- Sabouraud skålen *kan* erstattes av candida kromskål ved gjærsoppdyrking og identifikasjon av koloni *kan* foretas direkte fra kromskål.
- Ved soppdyrking fra positiv blodkulturer med mikroskopifunn av sopp bør kromskål legges til for raskere preliminær identifikasjon og vurdering av blandingsinfeksjon.
- Ved oppvekst på kromskål kreves minimum 3 døgns inkubering fra blodkultur og andre sterile prøver for å identifisere blandingskulturer.
- Kromogen agar kan benyttes for screening av *C.auris*, men MALDI-TOF MS obligatorisk for identifikasjon av mistenkte/mulige *C.auris* kolonier.
- Farge på kromogent medium bør samsvare med identifikasjon med MALD-TOF.
- Andre selektive medier for påvisning av gjærsoppinfeksjoner er lite brukt i Norge. Da kryptokokkinfeksjoner er en raritet anses ikke bruk av birdseed/fuglefrøagar eller andre spesialmedier å være nødvendige i ordinær diagnostikk, men ved kryptokokkdyrking anbefales inkubasjon på to temperaturer.
- Benyttet medium kan påvirke spekter ved identifikasjon med MALDI-TOF og fersk subkultur til anbefalt medium anbefales hvis problemer med identifikasjon, men det bør *vanligvis* ikke være nødvendig å benytte *produsentenes* egne medier (BD™ and BMX™ SDA medium). (10)

ANBEFALING 5 PRØVEPREPARERING OG EKSTRAKSJONSMETODE

- Det anbefales å avsette to spot på targetplaten pr agens.
- Produsentene anbefaler som rutine samme ekstraksjonsmetoder for bakterier og gjærsopp. Prøvepreparering bør følge produsentens egne anbefalinger.
- **Ekstraksjonsmetode**
 - direkte metode; mikrobe + matrix
 - hurtig ekstraksjonsmetode; mikrobe + maursyre + matrix
 - full etanol/maursyre ekstraksjon (Bruker)
- Direkte metode uten maursyre *kan* fungere for gjærsopp, men celleveggen krever ofte ekstraksjon for bedre spekter.
- For identifikasjon av gjærsopp *anbefales* prøvepreparering med «direkte metode» fra koloni med «hurtigekstraksjon» med 100 % maursyre for å bryte ned celleveggen til gjærsoppen. Når blandingen er lufttørret kan matriksen tilsettes. Ved identifikasjon av mukoide kryptokokker kan det være lurt å tilsette maursyre på platen *først* for deretter å røre mikroben inn i syren.
- Dersom man *ikke* kommer til målet med hurtigekstraksjon anbefaler **Bruker** full «etanol/maursyre ekstraksjon» Bibliotekene i Brukerdatabasen er bygget opp ved hjelp av denne ekstraksjonen.
- Dersom man ikke får tilfredsstillende identifikasjon anbefaler BD å gjenta analysering med ordinær ekstraksjonsmetode.
- Det kan synes som om anvendt teknikk for deponering på targetplaten/håndlag for de fleste gjærsopp er viktigere enn type plate og hvilken ekstraksjon som benyttes. Ulike studier spriker med hensyn til hva som faktisk fungerer best. Hvis man ikke lykkes med identifikasjon av gjærsopp bør man forsøke identifikasjon fra fersk subkultivering på anbefalt medium og man kan man vurdere å optimalisere både ekstraksjon og eventuelt bruk av type target plate. (8,11)

ANBEFALING 6 BRUK AV DATABASES

- Produsentene har oppdaterte bibliotek/databaser for sopp som stort sett fungerer svært bra for vanlige gjærsopp
- Databaser er i stadig utvikling, råd som gis i en strategirapport er derfor raskt utdaterte.
- Både MALDI Biotyper og VITEK MS identifiserer de vanligste gjærsopparter, mens VITEK MS mister eller feil-identifiserer noen flere sjeldne arter og Bruker har pr 2024 færre dimorfe sopp i sin ordinære database. (10,12) .
- Man må være klar over produsentens oppgitte begrensinger for entydig ID/consistency/matching hints osv. som for bakterier
- Bruk av de IVD og FDA godkjente databasene innebærer dårligere identifikasjon av sjeldne agens.
- Ved bruk av ikke-validerte databaser anbefaler BD/Bruker validering før disse tas i bruk.
- Det er mulig å benytte egendefinerte databaser, men IVDR og CE merking kan på sikt tenkes å komplisere bruk av egne og andre ikke kommersielle databaser.
- For gjærsopp blir nomenklaturen i databasene oppdatert uten referanse til tidligere navn eller eventuelt aktuelt artskompleks. **Når databaseoppdateringer foreligger bør laboratoriene bør ha rutine for å håndtere oppdaterte endringer i nomenklatur og kommentere nytt og gammelt navn/artskompleks i labdatasystemet, se detaljer under anbefaling 8. (10,13)**

ANBEFALING 7 KRITERIER FOR GODKJENNING TIL ARTSNIVÅ

- Produsentens anbefalinger/kriterier for cutoff for scoreverdi/prosent ID for godkjenning av identifikasjon tilstrebes, men for gjærsopp er lavere score/prosent ID vanlig og kan benyttes for sikker identifikasjon med noen begrensinger;
- **Bruker**; anbefaler cutoff for artsidentifikasjon som log score ≥ 2.0 , men flere publikasjoner beskriver sikker identifikasjon av gjærsopp til artsnivå med identifikasjons log score ≥ 1.7 , forutsatt for øvrig entydige identifikasjon/ «consistency», paralleller og eventuelle begrensinger oppgitt under «matching hints» - på lik linje med kriterier for bakterieartsidentifikasjon (14,15).
- Generelt forventes bedre scoreverdi når full ekstraksjons benyttes.
- **VITEK MS** angir score $\geq 90\%$ som tilfredsstillende for identifikasjon av gjærsopp. (16)
Alternative databaser som **MSI** (11) og **MicrobeNET** (17) kan benyttes for sikrere identifikasjon av sjeldne agens /dersom man mistenker at anvendt database ikke inneholder aktuell stamme, men disse databasene er vanligvis mindre aktuelle for identifikasjon av gjærsopp enn for muggsopp og dermatofytter.
- Laboratoriet bør tilstrebe å benytte oppdatert versjon/database og være klar over eventuelle fallgruver i benyttet system (12).

ANBEFALING 8 NOMENKLATUR

- Oppdaterte bibliotek og soppdatabaser (fra leverandører) benytter «nye»/ ikke innarbeide navn på gjærsopp med uten referanse til tidligere navn, eller eventuelt aktuelt artskompleks.
- **Det er ikke endelig konsensus i internasjonale medisinske mykologiske miljø om alle endringer innen nomenklatur av gjærsopp, og særlig vedrørende rapportering av nytt navn på tidligere candidaarter til kliniker. (1,18,19)**
- Nye navn utfordrer begrep som candidemi og medfører forvirring mtp innsending til NORM
- Nye non-Candida navn tar heller ikke høyde for EUCAST brytningspunktstabell for flukonazol for candidaarter uten spesifikke brytningspunkt.

- Laboratoriet bør oppgi både nytt og gammelt navn, eventuelt tilhørende artskompleks i henhold til internasjonale anbefalinger, ikke kun overføre navnet i aktuelt bibliotek uten kommentar og avvente navnendring til konsensus foreligger. (18,19)

ANBEFALING 9 KONVENSJONELLE FENOTYPISKE TESTER

- Konvensjonelle fenotypiske tester for identifikasjon av gjærsopp er ikke lengre i almen bruk og beskrives IKKE nærmere
 - Kimrør/Germtube; påvisning av *C.albicans*
 - Urease; *Cryptococcus spp.* og *Rhodotorula spp.* er urease positive.
Candida og *Trichosporon* har både urease positive og urease negative species.

ANBEFALING 10 MOLEKYLÆRE METODER VED IDENTIFIKASJON AV GJÆRSOPP FRA PRØVEMATERIALET

- *Candida* DNA påvisning finnes nå for utvalgte agens direkte i prøvematerialet
 - Blod (EDTA/serum)
 - Positiv blodkultur
 - Sterilt materiale
- Det finnes en kommersiell *C.auris* PCR til bruk i screening, men den er ikke i bruk i Norge på grunn av lav insidens og dessuten behov for dyrkning og resistensbestemmelse. Ulike plattformer med kommersiell PCR eller nye metoder eller kombinasjoner av slike omtales ikke nærmere.
- Bruk av molekulære metoder for påvisning av *Candida* DNA direkte i blod/serum inngår foreløpig ikke i internasjonale anbefalinger og slik diagnostikk bør eventuelt tilpasses aktuell pasientpopulasjon og kommende anbefalinger. (20,21, 22)
- Det er problematisk å anvende molekulære metoder for påvisning av *Candida* DNA direkte i prøvematerialet der *Candida* er en del av normalfloraen. Kun de vanligste *Candida*arter inngår i kommersielle tester, og sjeldne arter påvises ikke. Bruk av slike tester er foreløpig forbeholdt visse risikogrupper hvor påvisning av *Candida* DNA kan erstatte soppsekvensering i sterile materialer.

ANBEFALING 10 MOLEKYLÆRE METODER VED IDENTIFIKASJON AV GJÆRSOPP FRA KOLONI

- Molekulære metoder utover sekvensering anses ikke nødvendige for å komme i mål med identifikasjon fra koloni/oppsyrt materiale der massespektrometri ikke er entydig.
-

AVGRENSNINGER OG RELEVANTE PROBLEMSTILLINGER

Avgrensning:

Innlegget tar for seg *identifikasjon* av medisinsk relevante gjærsopp og vil i liten grad berøre problemstillinger knyttet til bruk av ulike plattformer med kommersiell PCR, nye metoder eller kombinasjoner av slike for påvisning av gjærsopp DNA direkte i prøvematerialet. Innlegget vil heller ikke inngående gå inn på problemstillinger knyttet til påvisning av dimorfe sopparter som er svært sjeldent forekommende i Norge.

De fleste problemstillinger knyttet til identifikasjon av gjærsopp er de samme som for bakterier og der dette er tilfelle blir ikke tema inngående utdypet i innlegget. Bruk av automatisert teknologi for avsetting av spot på plate/full automasjon omtales heller ikke nærmere (23). Påvisning av gjærsopp direkte i positiv blodkultur er bare nevnt og antas omtalt i eget innlegg. Konvensjonelle fenotypiske tester for identifikasjon av gjærsopp er ikke lengre i almen bruk og beskrives IKKE nærmere.

Relevante problemstillinger:

MALDI-TOF MS er en uovertruffen identifikasjonsmetode for gjærsopp og bør følge internasjonal standard. De fleste problemstillinger knyttet til bakterieidentifikasjon med massespektrometri vil også gjelde for gjærsopp. (24)

Metoden kan i stor grad erstatte fenotypiske og biokjemiske identifikasjonssystemer for gjærsopp. (1,2,3, 4) MALDI-TOF MS muliggjør en rask og korrekt identifikasjon og utgjør et stort fremskritt i moderne pasientbehandling. (9,20,21,22)

Mulighet for å identifisere gjærsopp direkte i positive blodkultur på lik linje med bakterier muliggjør påvisning av flere typer gjærsopp enn de som normalt inngår i kommersielle DNA baserte identifikasjonssystemer, alternativt kan massespektrometri fra tidlig vekst på skål bidra til rask identifikasjon av aktuelt agens og rettlede behov for alternativ behandling. (7,8)

Det er lite resistens mot aktuelle soppmidler i Norge og korrekt og rask identifikasjon kan benyttes til rådgivning mtp valg av antimykotika til pasienter som ikke har stått på langvarig behandling eller profylakse.

Gjærsopp dyrkes normalt på selektive medier som Sabouraud glukose/dextrose agar med kloramfenikol og gentamicin eller man benytter direkte utsæd på kromogene soppmedier. Ved soppdyrking fra positiv blodkultur med mikroskopifunn av sopp bør kromskålen legges til for raskere preliminær identifikasjon og vurdering av blandingsinfeksjon og skålen bør inkuberes i 3 døgn. Inkubering ved to temperaturer anbefales ved mistanke om kryptokokkinfeksjon. Kromogen agar benyttes for screening av *C.auris*, men MALDI-TOF MS er obligatorisk for identifikasjon av mistenkte/mulige *C.auris* kolonier. Andre selektive medier for påvisning av gjærsoppinfeksjoner er lite brukt i Norge. Kryptokokkinfeksjoner er en raritet og bruk av birdseed/fuglefrøagar eller andre spesialmedier anses ikke å være nødvendige ved kryptokokkdyrking.

SAB er anbefalt medium for videre identifikasjon med MALDI-TOF MS, men andre medier og kromskålen kan også benyttes. Farge og kolonimorfologi på kromskål kan gi en indikasjon på aktuell

art, men for entydig identifikasjon bør invasive isolat og isolat fra risikopasienter identifiseres med MALDI-TOF MS og funnet samsvare med fenotypisk identifikasjon/vekst på kromskål.

Teknisk utførelse for identifikasjon av gjærsopp sammenfaller i stor grad med identifikasjon av bakterier. Det anbefales å benytte 2 spot på platen og følge produsentens anbefalinger for ekstraksjon. Teknikk er sannsynligvis viktigere enn type plate forutsatt adekvat rengjøring av gjenbruksplater.

Det er mulig å komme til målet med direkte avsetting av gjærsoppen på plate kun med bruk av matrix *uten* forutgående ekstraksjon med maursyre, men for identifikasjon av gjærsopp *anbefales* prøvepreparering med «direkte metode» fra koloni med «hurtigekstraksjon» med 100% maursyre for å bryte ned celleveggen til gjærsoppen. Når blandingen er lufttørret på platen kan matriksen tilsettes. Ved identifikasjon av mukoide kryptokokker kan det være en fordel å tilsette maursyre på platen *først* for deretter å røre mikroben inn i syren.

Dersom man *ikke* kommer til målet med «hurtigekstraksjon» anbefaler **Bruker** full «**etanol/maursyre ekstraksjon**». Dette kan være særlig nyttig for «harde» sopparter som *Trichosporon*. Bibliotekene i Brukerdatabasen er bygget opp ved hjelp av denne ekstraksjonsmetoden. BD anbefaler å gjenta analysen med ordinær ekstraksjonsmetode.

Ved mistanke om dimorfe sopp/P3 organismer må inaktivering skje i sikkerhetskabinett på P3 lab med inaktivering/full ekstraksjon med etanol/maursyre, men inaktivert materiale kan tas med ut av P3 lab for videre identifikasjon. Identifikasjon med hjelp av MALDI-TOF MS av gjærformen av P3 organismer som *Histoplasma spp* eller *Coccidioides spp* kan være vellykket, men på generell basis skal identifikasjon av muggformen være bedre enn gjærformen-se annet innlegg. I Norge har vi knapt erfaring med slike infeksjoner. Bibliotekene oppdateres fortløpende med nye agens og man må forvente at også Bruker oppdaterer sin database med dimorfe sopp som BD/ VITEC MS har gjort. (12)

Det kan synes som om anvendt teknikk for deponering på plate for de fleste gjærsopp er viktigere enn type targetplate og hvilken ekstraksjon som benyttes. Ulike studier spriker med hensyn til hva som faktisk fungerer best. Hvis man ikke lykkes med identifikasjon av gjærsopp kan man optimalisere ekstraksjon og eventuelt bruk av type targetplate. (1,8,11)

Benyttet medium kan også påvirke spekter ved identifikasjon med MALDI-TOF og fersk subkultur til anbefalt medium anbefales hvis problemer med identifikasjon, men det bør *vanligvis* ikke være nødvendig å benytte *produsentenes* egne medier (BD™ and BMX™ SDA medium) (10)

BIBLIOTEK/DATABASER

Produsentene har oppdaterte bibliotek/databaser med spekter for ulike typer sopp. Både MALDI Biotyper og VITEC MS identifiserer de vanligste gjærsopparter. VITEC MS mister eller feil-identifiserer noen flere sjeldne arter og Bruker har færre dimorfe sopp i sin ordinære database. (10)

Bruk av de IVD og FDA godkjente databasene innebærer potensielt dårligere identifikasjon av sjeldne agens da disse ikke nødvendigvis ligger inne. Databasene er dessuten i stadig utvikling, råd som gis i en strategirapport er derfor raskt utdaterte.

Man må være klar over produsentens oppgitte begrensinger for entydig ID/consistency/matching hints osv. som for bakterier. Ved bruk av ikkevaliderte databaser anbefaler BD og Bruker validering før bruk. Det er også mulig å benytte egendefinerte databaser, men IVDR og CE merking kan på sikt tenkes å komplisere bruk av egendefinerte og andre ikke kommersielle databaser. (10,13)

For gjærsopp blir nomenklaturen i bibliotekene/databasene oppdatert uten referanse til tidligere navn eller eventuelt aktuelt artskompleks. Mange sopparter har tidligere hatt ulikt navn i kjønnnet og ukjønnnet form noe som skal være ivaretatt i hht «one fungus one name». Dette er i stor grad implementert i aktuelle malditof databaser, som ofte er raskt uten med å implementere nye navn, uten at dette nødvendigvis er helt konsistent. (Eksempel *Candida glabrata* men *Pichia kudriavzevii*).

Laboratoriene bør ha rutine for å oppdatere ny nomenklatur og kommenterer nytt og gammelt navn/artskompleks når databaseoppdateringer foreligger, men bør ikke adoptere alle nye endringer uten konsensus, se anbefaling 8.

KRITERIER FOR IDENTIFIKASJON

Spekteret sammenlignes med aktuelle spekter i instrumentets database og algoritmer beregner en logscore/scoreverdi/prosent ID hvor produsenten oppgir kriterier for sikker identifikasjon uten å ta hensyn til om agens er bakterie eller sopp. Produsentens anbefalinger tilstrebes, men for gjærsopp er en lavere score/prosent vanlig og kan ofte benyttes for sikker identifikasjon med noen begrensinger.

Bruker anbefaler cut-off for artsidentifikasjon log score ≥ 2.0 , men flere publikasjoner beskriver sikker identifikasjon av gjærsopp til artsnivå med log score ≥ 1.7 i Brukerdatabasen, forutsatt forøvrig entydige identifikasjon/ «consistency» og parallell- på lik linje med kriterier for bakterieartsidentifikasjon. Årvåkenhet anbefales der det er få spekter i databasen, som for bakterier. Generelt forventes bedre scoreverdi når full ekstraksjons benyttes. (14)

VITEK MS angir score $\geq 90\%$ som tilfredsstillende (16) Alternative databaser som **MSI** (11)

og **MicrobeNET** (17) kan benyttes for sikrere identifikasjon av sjeldne agens /dersom man mistenker at anvendt database ikke inneholder aktuell stamme, men disse databasene er vanligvis mindre aktuelle for gjærsopp enn for muggsopp og dermatofytter.

Laboratoriet bør tilstrebe å benytte oppdatert versjon/database og være klar over eventuelle fallgruver i benyttet system. Bruker og BD anbefaler validering ved bruk av lavere score/prosent ID enn systemet opererer med. (8,14,15)

Som for bakterier er kvaliteten på bibliotekene/databasene som benyttes essensielle for kvaliteten på identifikasjon og laboratoriene må jevnlig oppdatere i tråd med gjeldene anbefalinger (se annet innlegg). Ikke alle navndringer i databasene er velfunderte og forankret i et bredere fagmiljø og soppnomenklatur er utfordrende (se senere).

NOMENKLATUR

Taksonomi basert på molekylær fylogeni har reorganisert mykologien som tidligere baserte seg på morfologi og biokjemiske tester. Fenotypiske og biokjemiske tester klarte ikke å skille gjærsopp i ulike

artskompleks og feilidentifikasjon for enkelte arter var tidligere et stort problem, men med ny nomenklatur oppstår nye utfordringer.

Sopp er til forskjell fra bakterier mer komplekse, eukaryote organismer og samme art kan gjenfinnes i kjønnnet og ukjønnnet form ofte med ulike navn. Oppdaterte bibliotek og soppdatabaser benytter «nye»/ ikke innarbeide navn på gjærsopp uten referanse til tidligere navn, eller eventuelt tilhørighet til aktuelt artskompleks.(18)

Ikke alle nye navn er kvalitetssikret og «godkjent» av medisinske mykologer da de ikke tar hensyn til at sopp er komplekse organismer. Og selv nye, aksepterte og godkjente navn utfordrer i mange tilfeller innarbeidede begrep som candidemi og medfører forvirring mtp innsending til NORM, kliniske brytningspunkter og så videre. Nye non-Candida navn er ikke implementert i EUCAST brytningspunktstabell for flukonazol for candidaarter uten spesifikke brytningspunkt.

Det er ønskelig at man i Norge enes om, om, når og hvordan nye navn implementeres for å unngå forvirring- for sopp på samme måte som for bakterier. For sopp må man også ta hensyn til muligheten for ulike navn på kjønnnet/ukjønnnet form og nomenklatur i produsentenes bibliotek er ikke nødvendigvis kvalitetssikret/forankret i et bredt mykologisk fagmiljø. En internasjonal konsensus fra 2023 har forsøkt med en forsiktig tilnærming og råd for implementering av nye navn og norske laboratoriene bør følge denne og fremtidige oppdateringer (18).

Laboratoriet bør i hht konsensus på årets strategimøte oppgi både nytt og gammelt navn eventuelt tilhørende artskompleks i hht internasjonale anbefalinger, ikke kun overføre navnet i aktuelt bibliotek uten kommentar. (18,19)

Labdatasystemene vil være førende for hvordan navn kan gjengis, men inntil internasjonal konsensus mener referanselaboratoriet at Candida navnet fortsatt bør brukes med en kommentar om at nomenklatur er i endring og angi nytt/foreslått navn og eventuelt tilhørende artskompleks.

Annen identifikasjon

Ved tvil om artsidentifikasjon benyttes sekvensering (ITS2 eller D1D2 eller annet egnet målgen), alternativt helgenomsekvensering for identifikasjon av gjærsopp. (5)

Isolatet sendes referanselaboratoriet som verifiserer/utfører endelig identifikasjon. Ved spørsmål om utbrudd med Candida er helgenomsekvensering aktuelt, metode valideres på OUS 24/25.

Molekylære metoder for påvisning av gjærsopp direkte i prøvematerialet

Metoder for påvisning Candida DNA finnes nå for utvalgte agens direkte i prøvematerialet som blod (EDTA/serum), positiv blodkultur og sterile materiale. Ulike plattformer med kommersiell PCR eller nye metoder eller kombinasjoner av slike som ikke omtales nærmere i rapporten.

Det finnes en kommersiell *C.auris* PCR til bruk i screening, men den er foreløpig ikke i bruk i Norge pga svært lav insidens men også da det samtidig er behov for dyrkning og resistensbestemmelse.

Bruk av molekylære metoder for påvisning av Candida direkte i blod/serum inngår foreløpig ikke i internasjonale anbefalinger og slik diagnostikk bør tilpasses aktuelle pasientpopulasjoner og

kommende anbefalinger. ECMM utarbeider i samarbeid med ISHAM og ASM nye retningslinjer for diagnostikk og håndtering av candidainfeksjoner se [Candidiasis - ECMM](#)

Bruk av molekulære metoder for påvisning av Candida direkte i prøvematerialet er mulig men vanskeligjøres der candida er en del av normalflora og tilbys derfor fortrinnsvis i presumptivt sterile materialer. Ikke alle Candida arter inngår i kommersielle tester og bruk av slike tester er foreløpig forbeholdt visse risikogrupper hvor påvisning av Candida DNA kan erstatte soppsekvensering i sterile materialer (20,21,22).

For kryptokokker er en antigen test kommersielt tilgjengelig og det er lovende antigen tester for påvisning av endemiske soppinfeksjoner på markedet, men dette omtales ikke nærmere i denne rapporten (se strategimøtet for virologi/serologi 2024).

Molekulære metoder utover sekvensering anses ikke nødvendige for å komme i mål med identifikasjon fra koloni/oppsyrt materiale for gjærsopp.

Oppsummert

MALDI-TOF MS er en uovertruffen identifikasjonsmetode for gjærsopp. De fleste laboratorier utfører korrekt identifikasjon på de hyppigst forekommende gjærsopp, men må påse at man jobber med renkultur.

Sjeldne og uvanlige gjærsopp bør sendes til referanselaboratoriet for endelig identifikasjon, likeså alle gjærsopp fra pasienter med fungemi og alvorlige infeksjoner for verifisering av identifikasjon og resistensbestemmelse.

C. auris er nominativt meldepliktig og skal innsendes for overvåkning.

Rask identifikasjon til artsnivå av klinisk relevant gjærsopp kan vanligvis rettlede valg av behandling da ervervet resistens er uvanlig hos pasienter uten forutgående langvarig soppbehandling eller profylakse. Alle gjærsoppisolat fra blodkultur og invasive infeksjoner bør sendes til referanselaboratoriet. Candidaisolat fra blodkultur inngår i NORM overvåkingen og må sendes inn.

PROBLEMOMRÅDE 1

Kriterier for godkjenning av artsidentifikasjon, bruk av lavere log score/prosent ID. Bør man følge produsentens anbefalinger og hvis ikke må man validere bruk av lavere log score/prosent ID?

PROBLEMOMRÅDE 2

Bruk av ikke-validerede databaser. Uten mulighet for å benytte slike databaser blir det vanskelig å identifisere uvanlige gjærsopp.

Dette gjelder både «Research use only» (RUO) databaser fra Bruker MBT (RUO) og VITEK MS (SARAMIS) i tillegg til ikke kommersielle databaser som MSI og Mikrogen og egendefinerte databaser.

Bør bruken av slike og eksterne databaser valideres og bør alle laboratorier benytte slike databaser eller bare på referanselaboratoriet/ utvalgte avdelinger med større prøvevolum?

PROBLEMOMRÅDE 3

Kriterier for forsendelse til referanselaboratoriet; Gjærsoppisolat fra blod OG sterile områder/invasive infeksjoner samt alle nye *C.auris* isolat som er meldepliktig til MSIS skal sendes til referanselaboratoriet for verifisering av identifikasjon og resistensbestemmelse.

Alle laboratorier bør utføre resistensbestemmelse av gjærsopp med en validert kommersiell metode.

PROBLEMOMRÅDE 4

Nomenklatur, (anbefaling 8) Bibliotekene endrer navn uten hensyntagen til anbefalinger om å rapportere nytt og gammelt navn, og eventuelt aktuelt artskompleks.

Diskusjonen må også sees i relasjon til problemstilling knyttet til bakterier

PROBLEMOMRÅDE 5

Oppmuntrer full identifikasjon av normalflora til unødvendig behandling? (anbefaling 3)

REFERANSER

- 1 Patel, R. A Moldy Application of MALDI: MALDI-ToF Mass Spectrometry for Fungal Identification. *J. Fungi* 5, 4 (2019). [JoF | Free Full-Text | A Moldy Application of MALDI: MALDI-ToF Mass Spectrometry for Fungal Identification \(mdpi.com\)](#)
- 2 Lau AF. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight for Fungal Identification. *Clin Lab Med.* 2021 Jun;41(2):267-283. doi: 10.1016/j.cl.2021.03.006. Epub 2021 Apr 24. PMID: 34020763; PMCID: PMC8220872. [MALDI-TOF for Fungal Identification - PMC \(nih.gov\)](#)
- 3 Clark AE, Kaleta EJ, Arora A et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26: 547–603. [Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology - PMC \(nih.gov\)](#)
- 4 Robert MG, Cornet M, Hennebique A, Rasamoelina T, Caspar Y, Pondérand L, Bidart M, Durand H, Jacquet M, Garnaud C, Maubon D. MALDI-TOF MS in a Medical Mycology Laboratory: On Stage and Backstage. *Microorganisms.* 2021 Jun 12;9(6):1283. doi: 10.3390/microorganisms9061283. PMID: 34204665; PMCID: PMC8231132. [MALDI-TOF MS in a Medical Mycology Laboratory: On Stage and Backstage - PMC \(nih.gov\) Microorganisms.](#) 2021 Jun; 9(6): 1283.
- 5 Ying Zhao, Chi-Ching Tsang, Meng Xiao, Jasper F W Chan, Susanna K P Lau, Fanrong Kong, Yingchun Xu, Patrick C Y Woo, Yeast identification by sequencing, biochemical kits, MALDI–TOF MS and rep-PCR DNA fingerprinting, *MEDICAL MYCOLOGY*, Volume 56, Issue 7, October 2018, Pages 816–827, <https://doi.org/10.1093/mmy/myx118>

6 Salem-Bango Z, Price TK, Chan JL, Chandrasekaran S, Garner OB, Yang S. Fungal Whole-Genome Sequencing for Species Identification: From Test Development to Clinical Utilization. *J Fungi (Basel)*. 2023 Jan 29;9(2):183. doi: 10.3390/jof9020183. PMID: 36836298; PMCID: PMC9965959.

7 Faron ML, Buchan BW, Ledebøer NA. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Use with Positive Blood Cultures: Methodology, Performance, and Optimization. *J Clin Microbiol*. 2017 Dec;55(12):3328-3338. doi: 10.1128/JCM.00868-17. Epub 2017 Aug 30. PMID: 28855303; PMCID: PMC5703799.

8 REF Ghosh AK, Paul S, Sood P et al. matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid identification of yeasts causing bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21: 372–378.

9 Ref 9 Walsh T.J., McCarthy M.W. The expanding use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectroscopy in the diagnosis of patients with mycotic diseases. *Expert Rev. Mol. Diagn*. 2019;19:241–248. doi: 10.1080/14737159.2019.1574572.

10 Teke L, Barış A, Bayraktar B, Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for non-albicans *Candida* and uncommon yeast isolates, *Journal of Microbiological Methods*, Volume 185, 2021,106232, ISSN 0167-7012

11 Normand AC, Gabriel F, Riat A, et al. Optimization of MALDI-ToF mass spectrometry for yeast identification: a multicenter study. *Med Mycol*. July 1 2020;58(5):639–649.

12 Valero C, Buitrago MJ, Gago S, Quiles-Melero I, García-Rodríguez J, A matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry reference database for the identification of HISTOPLASMA CAPSULATUM, *MEDICAL MYCOLOGY*, Volume 56, Issue 3, April 2018, Pages 307–314.

13 Lévesque S, Dufresne PJ, Soualhine H, Domingo MC, Bekal S, Lefebvre B, Tremblay C. A Side by Side Comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS Technology for Microorganism Identification in a Public Health Reference Laboratory. *PLoS One*. 2015 Dec 10;10(12):e0144878. doi: 10.1371/journal.pone.0144878. PMID: 26658918; PMCID: PMC4689555

14 Vlek A, Kolecka A, Khayhan K et al. Interlaboratory comparison of sample preparation methods, database expansions, and cutoff values for identification of yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using a yeast test panel. *J Clin Microbiol*. 2014; 52: 3023–3029.

15 Pence M, Mcelvania T, Wallace M et al. Comparison and optimization of two MALDI-ToF MS platforms for the identification of medically relevant yeast species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33: 1703–1712.

16 Jamal WY, Ahmad S, Khan ZU, Rotimi VO, Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts, *International Journal of Infectious Diseases*, Volume 26, 2014, Pages 167-170, ISSN 1201-9712, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.05.031>.

17 Mikrobenet; [Identification of Yeasts Using MALDI-TOF | Fungal Diseases | CDC](#)

18 de Hoog S, Walsh TJ, Ahmed SA, Alastruey-Izquierdo A, Alexander BD, Arendrup MC, et al. A conceptual framework for nomenclatural stability and validity of medically important fungi: a proposed global consensus guideline for fungal name changes supported by ABP, ASM, CLSI, ECMM, ESCMID-EFISG, EUCAST-AFST, FDLC, IDSA, ISHAM, MMSA, and MSGERC. *J Clin Microbiol*. 2023;61(11):e0087323.

19 Borman AM, Johnson EM. Changes in fungal taxonomy: mycological rationale and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. 2023;36(4):e0009922.

20 Mendonça A, Santos H, Franco-Duarte R, Sampaio P, Fungal infections diagnosis – Past, present and future, *Research in Microbiology*, Volume 173, Issue 3, 2022, 103915, ISSN 0923-2508

21 Jenks JD, Gangneux JP, Schwartz IS, Alastruey-Izquierdo A, Lagrou K, Thompson Iii GR, Lass-Flörl C, Hoenigl M; European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Council Investigators. Diagnosis of Breakthrough Fungal Infections in the Clinical Mycology Laboratory: An ECMM Consensus Statement. *J Fungi (Basel)*. 2020 Oct 11;6(4):216. doi: 10.3390/jof6040216

22 Chen, Sharon C-A et al. Global guideline for the diagnosis and management of rare yeast infections: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM *The Lancet Infectious Diseases*, Volume 21, Issue 12, e375 - e386

23 Cherkaoui A, Riat A, Renzi G, Fischer A, Schrenzel J. Diagnostic test accuracy of an automated device for the MALDI target preparation for microbial identification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2023 Feb;42(2):153-159. doi: 10.1007/s10096-022-04531-3. Epub 2022 Dec 5. PMID: 36469165; PMCID: PMC9836989.

24 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for the Identification of Cultured Microorganisms Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*. 1st ed. Volume M58 Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne, PA, USA: 2017. [[Google Scholar](#)]