

Mykobakterier

Indikation

Mycobacterium tuberculosis (tuberkelbakterien) och andra mykobakterier s.k icke-tuberkulösa mykobakterier påvisas med mikroskopi, odling och DNA-tekniker. Mängden mykobakterier varierar, varför 3 prover bör tas vid olika tillfällen (dagar).

Odling utförs på samtliga provtyper, DNA-påvisning på alla provtyper förutom blod och mikroskopi endast på luftvägsprover.

Mikroskopi: Utförs alltid på sputum samt på andra luftvägsprov då detta begärts.

Mikroskopi har relativt låg känslighet och kompletteras alltid med odling. Förekomst av syrafasta stavar är dock inte liktydigt med förekomst av patogena mykobakterier, då ett stort antal icke-tuberkulösa mykobakterier förekommer. Akut mikroskopi utförs om svar önskas samma dag. Den akuta färgningsmetoden har tyvärr lägre känslighet.

DNA-påvisning: DNA-påvisning för *Mycobacterium tuberculosis* utförs på begäran på insänt material och kompletteras alltid med odling. Likvor och prov som är positiva vid mikroskopi undersöks rutinmässigt med DNA-påvisning. Positivt utfall behöver ej innebära förekomst av levande bakterier och metoden lämpar sig inte för att följa upp behandlingseffekt då döda bakterier kan detekteras efter utläkning. I analysen ingår även detektion av de vanligaste resistensmutationerna för resistens mot rifampicin och isoniazid. Vid fynd av *Mycobacterium tuberculosis*-DNA svaras även bedömning av känslighet mot dessa bägge antibiotika ut.

Odling: Mykobakterier växer långsamt – odlingstid upp till 6 veckor. Artbestämning sker med olika DNA-tekniker (specifika prober).

Vid växt av *Mycobacterium tuberculosis*-komplexet utförs resistensbestämning, dels fenotypiskt i flytande medium och dels baserat på helgenomsekvensering, som utförs av Klinisk genetik, patologi och molekylär diagnostik. Den modalitet som blir färdig först utgår som preliminärt svar och slutsvar baserar sig på sammanvägd bedömning av

båda modaliteter, undantaget pyrazinamid som endast baserar på genotypisk bedömning. Vid upprepade positiva odlingar från samma patient görs resistensbestämning med ett par månaders intervall.

Resistensbestämning mot icke-tuberkulösa mykobakterier kan utföras i Lund med prob-baserade tekniker för ett fåtal arter inklusive *M. avium*-komplexet och *M. abscessus* för makrolider och aminoglykosider, medan fenotypisk resistensbestämning utförs på referenslaboratorium.

Resistensbestämning för icke-tuberkulösa mykobakterier utförs endast på begäran. Generellt saknas kliniska brytpunkter för de flesta antibiotikapreparat och arter.

Bakgrund

Sjukdomen tuberkulos orsakas av bakterier som ingår i *Mycobacterium tuberculosis*-komplexet, främst *M. tuberculosis*. Vid aktiv sjukdom kan bakterier påvisas med olika tekniker (mikroskopi, odling och PCR). Då bakterien kan infektera alla organtyper kan prov behöva tas från olika delar av kroppen och skickas till laboratoriet för analys.

Den vanligaste lokalen för tuberkulos är lungorna och diagnosen ställs främst med luftvägsprov (t ex sputum eller ventrikelsköljvätska).

Mikroskopi av provmaterialet kan dels ge en fingervisning om förekomst av mykobakterier (syrafasta stavar) och dels ge en preliminär bedömning av smittsamhetsgraden (vid tuberkulos). Man kan dock inte säga att en patient är garanterat smittfri även om mikroskopiresultatet är negativt.

För att snabbt ställa tuberkulosdiagnosen, analyseras de flesta prov med PCR vilket detekterar alla arter som ingår i *M. tuberculosis*-komplexet. Eftersom PCR inte kan skilja *M. tuberculosis* från vaccinstammen (*Mycobacterium bovis*-BCG) är det viktigt att sådan frågeställning framgår av remissen (abscess efter vaccination eller problem efter BCG-behandling av urinblåscancer). Odling är den metod som har högst känslighet i att detektera *M. tuberculosis* vilket innebär att odlingen mycket väl kan vara positiv trots negativ mikroskopi och PCR. Odlingen behövs också för resistensbestämning och epidemiologisk typning. PCR och/eller mikroskopi kan vara positiv trots att odlingen senare blir negativ eftersom dessa analyser kan detektera döda bakterier.

Förutom bakterier tillhörande *M. tuberculosis*-komplexet, kan ett stort antal icke-tuberkulösa mykobakteriearter (NTM) odlas från olika provmaterial. De allra flesta NTM-arter är typiska opportunistiska patogener som nästan

uteslutande infekterar individer med nedsatt immunförsvar. NTM-arter odlas på samma sätt som arter tillhörande *M. tuberculosis*-komplexet varför samma remiss och frågeställning kan användas. Ett undantag finns: *M. marinum*, som främst orsakar hud och mjukdelsinfektioner hos personer som haft mycket kontakt med vatten (t.ex. akvarieägare), kräver en lite annorlunda odlingsmiljö än övriga mykobakterier varför det är viktigt att sådan frågeställning framgår av remissen.

Mycobacterium leprae kan inte odlas vid vanliga rutinlaboratorier varför sådan diagnostik inte utförs.

Kontakta gärna tuberkulosenheten vid Klinisk Mikrobiologi, Labmedicin Skåne, för diskussion om provtyper och analysvar.

Provtagning

Provmaterial är infektiöst. Se till att alla korkar och lock sluter tätt och att inget spill finns på provkärlens utsidor. **Använd alltid ytterburk/hylsa.**

Tillsätt ej formalin eller sprit.

OBS! Om patienten själv ska ta provet, glöm ej informera om provtagningsteknik.

Sputum

Viktigt att provet verkligen kommer från de nedre luftvägarna, tas före frukost, gärna med hjälp av sjukgymnast. Tre prov i plastburk för sputumprov från olika dagar rekommenderas.

Ventrikelskölvätska

Provtagning sker på fastande mage med 200 mL sterilt vatten på vuxna och med 10 mL på små barn. Tre prov i plastflaska (200 mL) från olika dagar rekommenderas.

Urin

Ca 150-200 mL morgonurin. Tre prov i plastflaska (200 mL) från olika dagar rekommenderas.

Pleura, Ascites

Minst 10 mL i rör, sterilt eller plastflaska. Större mängd provmaterial ger bättre diagnostiskt utbyte.

Bronksekret/sköljväska

3-10 mL i sterilt rör utan tillsats.

Sårsekret, punktat, vävnadsbitar mm

Sterilt rör utan tillsats. Rikligt med material ger bästa utbytet.

Benmärg

Sterilt rör utan tillsats.

Faeces

En sked i plaströr för faecesprov.

Blod

1 - 5 mL blod sprutas i Bactec Myco/F Lytic-flaska.

Mikroskopi och DNA-påvisning utförs inte då det ger tveksamt diagnostiskt utbyte.

Likvor

1-5 mL i sterilt rör. DNA-påvisning och odling utförs alltid. Mikroskopi om provmängden tillåter och endast på begäran. Större mängd ger bättre diagnostiskt utbyte.

Svar/Tolkning/Bedömning

Positiva fynd från tidigare ej kända patienter telefonbesvaras alltid.

Mikroskopi

Utförs vardagar. Svar inom 1-3 arbetsdagar

- Negativ: Inga mykobakterier iakttagna
- Positiv: Mykobakterier påvisade

DNA-påvisning

Utförs vardagar. Svar inom 1-3 arbetsdagar

- Negativ: *Mycobacterium tuberculosis* DNA ej påvisat. Separat svar på odling vid slutsvar.
- Positiv: *Mycobacterium tuberculosis* DNA påvisat. Separat svar på odling slutsvar. Detta behöver ej innebära förekomst av levande bakterier

Vid alla positiva eller negativa delsvår följer kommentaren: "Observera att analysen M.tuberculosis DNA (BDMax PCR) endast är ackrediterad för sputum".

- Ej bedömbär: Provet innehåller inhibitorer för PCR-reaktionen som därför ej kan bedömas. Odling pågår.

Odling

Utförs vardagar. Negativa odlingar besvaras efter 6 veckor. Positiva odlingar besvaras oftast inom 2-4 veckor. Resistensbestämning preliminärbesvaras baserat på fenotypisk resistensbestämning oftast inom 2 veckor efter positiv odling, slutsvar efter sammanvägd bedömning med helgenomsekvensering kan förväntas efter ytterligare 1-2 veckor.

- Negativ: Ingen växt av mykobakterier
- Positiv: Växt av *Mycobacterium*.....(här anges arten)
- Ej bedömbär: Mykobakterieodlingen förorenad av ovidkommande bakterier, nytt prov rekommenderas.

Metodik/mätprincip

Mikroskopi

Mikroskopi för påvisande av mykobakterier är en enkel och snabb metod vid misstanke på infektioner med mykobakterier. Den fettrika cellväggen hos mykobakterierna gör att de inte avfärgas med svavelsyra.

Två olika metoder används:

Ziehl-Neelsen färgning där preparatet färgas med karbolfuchsin. Mykobakterierna kvarstår röda efter avfärgning med syra och kontrastfärgning med metylenblått.

Fluorescensfärgning där preparatet färgas med auraminfärg och avfärgas med syra. Mykobakterierna fluorescerar vid avläsning i fluorescensmikroskop.

Mikroskopi har låg sensitivitet. Det krävs vanligen >10⁴ bakterier per mL för positivt utfall.

DNA-påvisning

Analysen utförs på BD MAX-systemet och är ett automatiserat kvalitativt in vitro-diagnostiskt test för direkt detektion av DNA från *Mycobacterium tuberculosis*-komplex (MTBC) från behandlat provmaterial. Testet använder av realtids-polymeraskedjereaktion (PCR) för att amplifiera DNA-targets och fluorogena målspecifika hybridiseringsprober för att detektera både MTBC-DNA och DNA associerat med mutationer i rpoB- och katG-gener och promotorregionen inhA som är associerad till multiresistent TB.

Odling

Mykobakterier är syrafasta stavformade bakterier som växer långsamt. Provet bör inte vara kontaminerat med andra bakterier eftersom de senare då växer snabbare och försvårar avläsningen. Därför förbehandlas de flesta prov med natrium-lauryl-sulfat (SDS) som avdödar andra bakterier och homogeniserar provet. Sedan centrifugeras provet för att få ner mykobakterierna i botten. Bottensatsen odlas till ett BBL MGIT-rör och till ett Löwenstein-Jensen-rör. Odlingen är kvalitativ eftersom odlingen är specifik.

Referenslitteratur

Referensmetodik. Nedre luftvägsinfektioner inklusive mykobakteriologisk diagnostik. Se Folkhälsomyndighetens hemsida. (Föreningen för Klinisk mikrobiologi)