



Nationella rekommendationer för prioriteringskriterier för ehec-isolering

Utarbetade av Folkhälsomyndigheten inför dialogmöte 2024-02-09, reviderade efter inkomna synpunkter 2024-03-25.

Kontaktperson: Inga Fröding, Enheten för laborativ bakterieövervakning.
inga.froding@folkhalsomyndigheten.se

Bakgrund:

Förbättrad diagnostik och inkludering av ehec i allmän bakteriell fecesdiagnostik med PCR genererar många fler positiva ehec-prover än vad tidigare diagnostik utförd på riktad frågeställning gjorde. Detta innebär att allt mer resurser krävs för att utföra isoleringsförsök på ehec-positiva prover. Samtidigt är en omfattande isolering av ehec av stor vikt för ett effektivt smittskydd, inklusive smittspårning och kunskapsuppbyggnad.

Följande förslag för nationella rekommendationer för prioritering av isolering av ehec har utarbetats för en likriktad och ändamålsenlig hantering i landet med syftet att minska arbetsbelastningen avseende isolering samtidigt som ett effektivt smittskydd bibehålls.

Tidig information om Stx1/Stx2 är viktigt för smittskyddsarbete och för att bedöma risk för HUS. Det är därför viktigt att särskiljning av Stx1 och Stx2 utförs skyndsamt på alla Stx-positiva prover, om det inte automatiskt ingår i primärdiagnostiken.

Rekommendationer för prioritering av isoleringsförsök

- Rekommendationerna är applicerbara när ehec-diagnostik ingår i allmän bakteriell feces-diagnostik. Om ehec-diagnostik däremot endast utförs på patienter med riktad frågeställning om ehec bör isoleringsförsök utföras på alla Stx-positiva prov.
- Isoleringsförsök bör minst utföras på prover från nedanstående patientgrupper, se ”Kriterier för isoleringsförsök”.
- Kliniska uppgifter för identifiering av allvarlig sjukdom, tas med i bedömningen i mån av tillgänglighet. Om laboratoriet saknar dessa uppgifter behöver aktivt inhämtande inte ske från laboratoriet och isoleringsförsök behöver inte utföras primärt.
- Ehec/Stx-positiva patientprover där isoleringsförsök ej utförs bör sparas i kylskåp i minst 30 dagar så att isoleringsförsök kan göras på begäran av smittskydd eller behandlande läkare. Observera dock att chansen att

Kommenterad [AJ1]: alternativt: använda tillgängliga resurser på bästa sätt

Kommenterad [AJ2]: Den regionala smittskyddsmyndigheten har ofta sådan information på ett relativt tidigt stadium vilken då delas med det regionala laboratoriet.

Kommenterad [AJ3]: Se föregående kommentar: det regionala smittskyddet brukar ha information om allvarliga fall inom den första halvan av angivet tidsintervall.

isoleringsförsöket lyckas minskar över tid, där ehec kan tappa sina Stx-kodande mobila genomiska element (MGE) både *in vivo* och *in vitro*. [1]

Kriterier för isoleringsförsök

- Förstagångsprov, samt uppföljande prov med identiskt PCR-resultat som ej isolerats tidigare, med följande indikationer:
 - **Inhemska smitta/okänt smittland/uppgift om smittland saknas:**
 - Samtliga Stx2-positiva prov
 - Stx1-positiva prov från:
 - Patient med misstänkt eller bekräftad HUS
 - Barn 0-6 år
 - Inlagd patient
 - Anamnes som talar för allvarlig sjukdom/kolit (feber, blod i avföringen)
 - **Utlandssmitta:**
 - Alla Stx-positiva prov från:
 - Patient med misstänkt eller bekräftad HUS
 - Barn 0-6 år
 - Inlagd patient
 - Anamnes som talar för allvarlig sjukdom/kolit (feber, blod i avföringen)
 - **Efter särskild begäran från beställare/smittskydd/vårdhygien**
 - Epidemiologisk koppling till gård aktuell för gårdsutredning
 - Misstänkt utbrott
 - Annan indikation
- Prioritering genom ett tröskelvärde baserat på Ct-värdet kan vara lämpligt och rimligt om stamisolering sällan lyckas vid svaga PCR-resultat. Om en Ct-gräns används är det viktigt att ta hänsyn till eventuella skillnader i PCR-metoder och analysflöden mellan laboratorier inom regionen.
Vid misstänkt eller bekräftad HUS bör dock isoleringsförsök utföras oavsett Ct-värde då isolering är extra viktigt vid denna diagnos.

Laboratorier som utför primärdiagnostik för ehec, men inte själva utför isolering av ehec bör skicka prover som uppfyller ovanstående kriterier till annat laboratorium för isolering.

Vid misslyckat isoleringsförsök på prover från patienter med HUS bistår Folkhälsomyndigheten med stöd och vid behov extra isoleringsförsök. I dessa fall kontaktas Folkhälsomyndigheten via kundtjänst mikrobiologi 010-205 24 44, kundtjanst.mikrobiologen@folkhalsomyndigheten.se, för diskussion innan originalprover skickas till Folkhälsomyndigheten.

Kommenterad [AJ4]: Smittskydden välkomnar reduktionen av åldersintervallet från det ursprungliga förslaget 0-9 år till nu föreslagna 0-6 år. Vi ser väldigt sällan allvarliga sjukdomsfall och då särskilt med endast Stx1-koppling hos barn äldre än 6 år. Eventuella allvarliga fall (HUS etc) utanför detta åldersintervall kan bli anledning till särskild kontakt mellan beställare/smittskydd och det regionala laboratoriet.

Kommenterad [AJ5]: För det regionala smittskyddets arbete är identifikation av Stx1/Stx2 den viktigaste informationen för smittskyddsåtgärder vid fall med utlandskoppling. Isolering vid ett enskilt fall smittat i utlandet fyller sällan någon roll i det fortsatta smittskyddsarbetet på regional nivå men vi kan förstå om det för internationellt samarbete är värdefullt med utbyte av typningsdata jämte epidemiologisk information. Se nedanstående paragraf om kostnader.

Tips för optimering av isoleringsförfarande

- Användning av en billig in-house PCR som detekterar toxingenerna Stx1, Stx2 och Stx2f.
- Användning av selektiv agar som t.ex. CT-SMAC och/eller CHROMagar™ STEC.
- Gör utstryket på primärplattan på ett sådant sätt att fria kolonier erhålls.
- Om flera kolonier ska analyseras med PCR är pooling ett effektivt arbetsätt.

Utförlig beskrivning av den metod som används vid Folkhälsomyndighetens laboratorium finns i bilaga 1.

Ytterligare råd för val av primärdiagnostik

Vissa diagnostiska kit påvisar inte alla Stx-subtyper. Särskilt Stx2f som är genetiskt avvikande detekteras ofta inte av kommersiella kit.[2] Samtliga Stx-subtyper kan dock medföra HUS [3], och det är eftersträvarvärt att alla Stx-subtyper detekteras, åtminstone vid allvarliga fall och HUS. Risken för HUS vid Stx2f-bärande ehec är dock lägre än vid t.ex. Stx2a-bärande ehec och i motsvarande nivå som för Stx1-bärande ehec.[3]

Om laboratoriets primärdiagnostik inte kan påvisa Stx2f-bärande EHEC är det därför önskvärt om prov från HUS-fall screenas med en Stx2f-riktad PCR, om möjligt.

Kostnadsaspekter

Ehec är enligt smittskyddslagen klassad som allmänfarlig sjukdom och är smittspåringspliktig. I smittskyddslagen (2004:168) och SLIM-överenskommelsen [4] framgår regionernas ansvar för smittskyddsarbete respektive Folkhälsomyndighetens ansvar för nationell övervakning.

För ehec innebär detta att regionerna ansvarar för den diagnostik- och isoleringskostnad som är nödvändig ur smittskyddssynpunkt. Folkhälsomyndigheten står för typning med helgenomsekvensering och extra isoleringsförsök vid HUS inom ramen för det nationella mikrobiella övervakningsprogrammet.

Den aktuella prioriteringen av vilka prover som är viktigast att utföra ehec-isoleringsförsök på är ett sätt att hantera de ökande kostnader som den ökade påvisningen av ehec hos milda fall innebär. Prioriteringen innebär en balanserad avvägning mellan behovet av en bred typning för ett effektivt smittspåringsarbete och kostnaden för isolering. Kostnaden för isolering kan också hållas relativt låg om ovanstående tips för isoleringsförfarande följs.

Kommenterad [AJ6]: Här vore det önskvärt med ett förtydligande om detta även innefattar isoleringsförsök (efter Stx-bestämning) av prover från utlandssmittade. Se ovanstående kommentar.

Övrigt

Om ett laboratorium utvärderar och implementerar tröskelvärde baserat på Ct-värden för selektion av prover som isoleringsförsök utförs på, får man gärna dela resultat av sådan utvärdering med Folkhälsomyndigheten genom kontaktpersonen ovan.

Referenser

1. Senthakumaran, T., et al., *Implications of Stx loss for clinical diagnostics of Shiga toxin-producing Escherichia coli*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018. **37**(12): p. 2361-2370.
2. Cointe, A., et al., *Be aware of Shiga-toxin 2f-producing Escherichia coli: case report and false-negative results with certain rapid molecular panels*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2020. **98**(4): p. 115177.
3. Panel, E.B., et al., *Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC*. EFSA Journal, 2020. **18**(1): p. e05967.
4. Folkhälsomyndigheten, *Ett laboratorienätverk för smittskydd och mikrobiologi i Sverige - Överenskommelse om ansvar för funktioner av betydelse för ett laboratorienätverk 2015*. **2024-03-21** (<https://www.folkhalsomyndigheten.se/contentassets/588d98a6865d40d8a6b3e14aabfe6823/overenskommelse-laboratorienatverk-ansvar.pdf>).

Bilaga 1: Ehec-isolering vid Folkhälsomyndigheten

Vid isolering av ehec på Fohm används en in-house PCR som detekterar Stx1, Stx2, Stx2f och eae i kombination med odling på selektiva plattor.

Tillvägagångssätt:

1. Odling av prov på SMAC, CT-SMAC och CHROMagar™ STEC. Utstryket görs på ett sådant sätt att fria kolonier kan identifieras.
2. Från SMAC-plattan görs ett s.k. "storkok", dvs. ett svep med 10µL ögla från primärstryket som slammas i 5mL PBS och kokas i minst 20 min i 100°C. Röret centrifugeras och PCR körs på supernatanten.
 - a) Frånvaro av toxingener i storkoket innebär att provet inte innehåller Ehec och inget isoleringsförsök görs.
 - b) Närvaro av toxingener i storkoket innebär att provet innehåller Ehec och isoleringsförsök påbörjas.
3. Avläsning av kolonimorfologi: Observera färg på kolonierna vid avläsningen av plattorna.
 - a) Bleka kolonier på SMAC platta är sorbitolnegativa, bl.a. ehec O157:H7. Sorbitolfermenterande bakterier växer med rosa/röda kolonier (övriga serotyper).
 - b) På CT-SMAC växer ehec O157 med bleka/färglösa kolonier medan övriga ehec/*E. coli* växer med rosa kolonier.
 - c) På CHROMagar™ STEC växer Stx-producerande *E. coli* med lila-bruna kolonier medan övriga Enterobacterales hämmas eller växer med blå eller ofärgade kolonier. Se bild på <https://www.chromagar.com/product/chromagar-stec/>.
4. Utifrån morfologin på plattorna avgörs hur vi går vidare.
5. Fria kolonier från valda plattor tas/plockas med 1µL ögla, slammas i 100µL PBS, kokas i 12 min i 98°C. Märk tydligt på plattan vilka kolonier som plockats (om halv koloni plockas). Alternativt plockas en hel koloni och renstryks på en ny agarplatta varefter samma ögla slammas i 100 µL PBS. Företrädesvis plockas ca 5 kolonier från vardera CT-SMAC och CHROMagar™ STEC.
6. Om första försöket, enligt punkt 5, blir negativt kan man behöva undersöka många fria kolonier. Då kan man poola ihop flera kolonier (t.ex. 5-10 st) i samma koklysat för att köra realtids-PCR på. För den PCR-pool som blir positiv får man sedan dela upp och köra kolonierna var för sig i PCR för att hitta "rätt".

Om ingen växt finns på de selektiva plattorna plockas fria kolonier från SMAC. Tänk på att plattan inte är selektiv och därför behöver flera kolonier plockas.

Ändrad fältkod