



Folkhälsomyndigheten

Ehec-diagnostik vid Sveriges kliniska mikrobiologiska laboratorier 2015

Rapport från en enkätundersökning



Ehec-diagnostik vid Sveriges kliniska mikrobiologiska laboratorier 2015

Rapport från en enkätundersökning

Bindningar och jäv

För Folkhälsomyndighetens egna experter och sakkunniga som medverkat i rapporter bedöms eventuella intressekonflikter och jäv inom ramen för anställningsförhållandet.

När det gäller externa experter och sakkunniga som deltar i Folkhälsomyndighetens arbete med rapporter kräver myndigheten att de lämnar skriftliga jävsdeklarationer för potentiella intressekonflikter eller jäv. Sådana omständigheter kan föreligga om en expert t.ex. fått eller får ekonomisk ersättning från en aktör med intressen i utgången av den fråga som myndigheten behandlar eller om det finns ett tidigare eller pågående ställningstagande eller engagemang i den aktuella frågan på ett sådant sätt att det uppkommer misstanke om att opartiskheten inte kan upprätthållas.

Folkhälsomyndigheten tar därefter ställning till om det finns några omständigheter som skulle försvåra en objektiv värdering av det framtagna materialet och därmed inverka på myndighetens möjligheter att agera sakligt och opartiskt. Bedömningen kan mynna ut i att experten kan anlitas för uppdraget alternativt att myndigheten föreslår vissa åtgärder beträffande expertens engagemang eller att experten inte bedöms kunna delta i det aktuella arbetet.

De externa experter som medverkat i framtagandet av denna rapport har inför arbetet i enlighet med Folkhälsomyndighetens krav lämnat en deklARATION av eventuella intressekonflikter och jäv. Folkhälsomyndigheten har därefter bedömt att det inte föreligger några omständigheter som skulle kunna äventyra myndighetens trovärdighet. Jävsdeklarationerna och eventuella kompletterande dokument utgör allmänna handlingar som normalt är offentliga. Handlingarna finns tillgängliga på Folkhälsomyndigheten.

Denna titel laddas ner från: www.folkhalsomyndigheten.se/publicerat-material/.

Citera gärna Folkhälsomyndighetens texter, men glöm inte att uppge källan. Bilder, fotografier och illustrationer är skyddade av upphovsrätten. Det innebär att du måste ha upphovsmannens tillstånd att använda dem.

© Folkhälsomyndigheten, 20x16.

Artikelnummer: 16039

ISBN 978-91-7603-670-9 (pdf)

Förord

Denna rapport beskriver hur primärdiagnostiken ser ut för ehec vid landets kliniska mikrobiologiska laboratorier. Sammanställningen baseras på en enkätundersökning som genomfördes hösten 2015. Undersökningen genomfördes för att få en enhetlig bild över ehec-diagnostiken då det är känt att analysalgoritmer och metoder varierar i landet och att dessa variationer kan påverka hur många fall av laboratorieverifierade infektioner av ehec som anmäls inom de olika länen.

Syftet med rapporten är att utgöra ett underlag till Folkhälsomyndigheten och smittskyddsläkare i tolkningen av antalet anmälda fall av ehec.

Ansvarig för rapporten har varit Petra Edquist, tf chef för enheten för laborativ bakterieövervakning och sammanställningen har utförts av Camilla Sundborger och Cecilia Jernberg. Samtliga svenska kliniska mikrobiologiska laboratorier som utför human ehec-diagnostik, det vill säga Klinisk mikrobiologi Halland, Region Skåne, Centralsjukhuset Karlstad, Universitetssjukhuset Linköping, Kalmar, Uppsala Akademiska sjukhus, Centrallasarettet Växjö, Sahlgrenska Universitetssjukhuset, Norrlands Universitetssjukhus, Karolinska Universitetssjukhuset, Länssjukhuset Ryhov, Gävleborg och Unilabs Skövde har bidragit till rapporten genom att besvara enkätundersökningen.

Karin Tegmark Wisell
Avdelningschef avdelningen för mikrobiologi

Folkhälsomyndigheten

Innehåll

Sammanfattning.....	8
Summary.....	9
EHEC primary diagnostics at the Swedish clinical microbiological laboratories.....	9
Bakgrund och syfte.....	10
Metod.....	12
Webbenkät	12
Resultat.....	13
Laboratorier som utför ehec-diagnostik.....	13
Kriterier för när ehec-analys ska utföras	13
Metodik för påvisning samt isolering.....	14
Diskussion	16
Referenser	18

Sammanfattning

För att få en enhetlig bild över hur primärdiagnostiken ser ut för ehec skickades en webbaserad enkät ut till alla landets kliniska mikrobiologiska laboratorier under hösten 2015. Cirka hälften av laboratorierna tillhandahöll analyser för påvisning av ehec. Det skiljde sig mellan de olika regionerna avseende vilka kriterier som användes gällande när analys skulle utföras. Även analysmetodiken varierade mellan de olika laboratorierna. Dessa skillnader påverkar hur många fall av laboratorieverifierade infektioner av ehec som anmäls inom de olika länen.

Summary

EHEC primary diagnostics at the Swedish clinical microbiological laboratories

To get a consistent picture of how primary diagnostics is performed in Sweden for analysis of EHEC infections, an online questionnaire was distributed to all the clinical microbiological laboratories during the fall 2015. The results showed that approximately half of the laboratories provided analysis for the detection of EHEC. It differed between regions in terms of the criteria used for when the analysis was done. There were in addition methodological differences between the laboratories. In conclusion, these differences have an impact on how many cases of laboratory confirmed infections of EHEC are reported in the various counties.

N.B. The title of the publication is translated from Swedish, however no full version of the publication has been produced in English.

Bakgrund och syfte

För att få en tydligare bild över hur primärdiagnostiken för ehec ser ut i Sverige utfördes under oktober-december 2015 en enkätundersökning riktad till de kliniska mikrobiologiska laboratorierna. Denna enkätundersökning är en del av ett projekt för ökad krisberedskap i landet som finansieras av myndigheten för samhällsskydd och beredskap (MSB). Projektet är ett samarbete mellan Folkhälsomyndigheten, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) och Livsmedelsverket. Sedan tidigare har så kallade strategidokument tagits fram för myndigheternas hantering av zoonoserna ehec [1] salmonella, campylobacter, yersinia, listeria och cryptosporidium. Genomgående uttrycker strategidokumentet ett behov av en sektorsövergripande samordning av övervakningen av dessa smittämnen, dvs en samordning av de metoder som leder fram till fynd av dessa smittämnen i människor, livsmedel och hos djur. Det övergripande projektet där denna enkätundersökning ingår fokuserar på de processer som leder fram till att ett fall detekteras och rapporteras, inklusive de primärdiagnostiska ansatser som används inom olika landsting. Denna rapport är en sammanställning över de enkätsvar som landets kliniska mikrobiologiska laboratorier varit behjälpliga med att svara på för att beskriva hur, när och var ehec-diagnostiken bedrivs i Sverige.

Ehec är en *E. coli* som bär på förmågan att producera shigatoxin. Infektionen förekommer i alla åldersgrupper, men drabbar framför allt småbarn. Den kan ge blodig diarré och även leda till njursvikt på grund av så kallat hemolytiskt uremiskt syndrom (HUS). Eftersom bakterierna ofta orsakar blodig diarré hos människa kallas de enterohemorragiska *E. coli* (ehec). Infektionen kan vara alltifrån mild till att ha dödlig utgång, vilket är relativt ovanligt. Ehec isoleras även från symptomfria bärare vid till exempel smittspårningsutredningar där en familjemedlem är sjuk medan andra i familjen kan bära på ehec utan att ha visat symptom.

Från cirka 60 procent (327 st) av alla rapporterade fall (551 st) av ehec-infektion under 2015 kunde en stam isoleras och skickas in till Folkhälsomyndigheten för epidemiologisk typning och karaktärisering. De resterande fallen var laboratoriekonfirmerade endast genom PCR. Detta är i linje med smittskyddslagens falldefinition (2004:168) [2] för ehec gällande laboratoriekriterier för anmälan enligt smittskyddslagen som lyder:

Minst ett av följande fynd:

- isolering av *E. coli* som har förmåga att producera shigatoxin (stx) eller som bär på *stx1/stx2* gener
- påvisande av *stx1* och/eller *stx2*-gener från kliniskt prov (utan isolering av stam)
- påvisande av shigatoxin i feces (utan isolering av stam)

I falldefinitionen uppmanas försök till isolering av stam för vidare karaktärisering vilket är viktigt vid bland annat smittspårning och utbrottshantering.

Det finns en rad olika selektiva odlingsmedier för ehec att tillgå vid isoleringsförsök efter PCR-positivt resultat, medier som ska trycka tillbaka vår normalflora som finns i proverna. Dessa medier varierar avseende vilka serotyper som de bäst kan selektera fram. Den historiskt vanligaste serotypen ehec O157:H7 identifieras lättast på SMAC (Sorbitol MacConkey-agar), alternativt CT-SMAC (tillsats av cefixim och kaliumtellurit) [3]. Ehec O157:H7 är sorbitolnegativ (med några få undantag) vilket innebär att kolonierna blir bleka på odlingsplattorna till skillnad från de sorbitolfermenterande som blir rosa. Cefixim och kalium-tellurit trycker tillbaka andra bakteriearter såsom proteus. En annan vanlig serotyp, ehec O26, är istället ramosnegativ vilket innebär att kolonierna blir bleka på CT Ramos MacConkey-agar (CT-RMAC). Förutom val av odlingsmedium kan isolering av stam vara utmanande vid lägre koncentrationer av ehec-bakterier i provmaterialet på grund av överväxt av toxinnegativa E. coli med samma koloniutseende.

Det finns således olika metoder att tillgå både gällande PCR- och odlingsmetodik. Förutom detta så skiljer det sig mellan olika landsting och regioner i Sverige avseende när ett patientprov analyseras för ehec, något som denna rapport visar.

Metod

Webbenkät

Uppgifter om ehec-diagnostiken samlades in via en webbenkät som distribuerades till alla kliniska mikrobiologiska laboratorier i Sverige. Enkäten innehöll frågor som framför allt skulle beskriva vilken metodik som användes samt vilka kriterier som tillämpades gällande vilka prov som diagnosticerades för ehec. Vid oklarhet i svar togs kontakt med svarande laboratorium.

Resultat

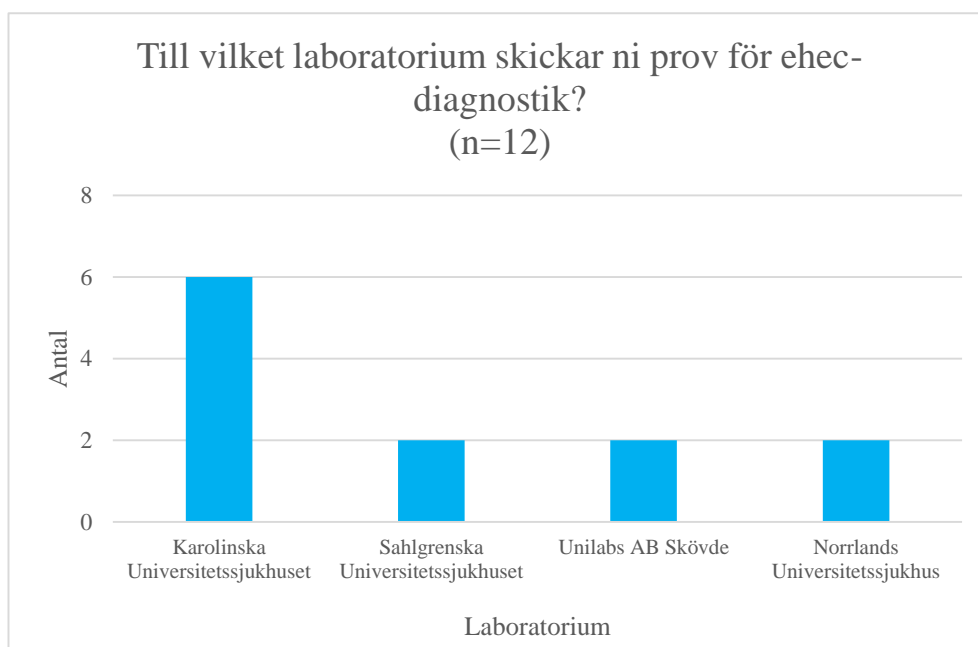
Laboratorier som utför ehcc-diagnostik

Alla landets kliniska mikrobiologiska laboratorier svarade på enkäten (25/25).

Tretton laboratorier svarade att de utför ehcc-diagnostik och resterande tolv laboratorier svarade att de inte utför detta utan skickar ehcc-frågeställningar vidare till annat laboratorium. Det är fyra laboratorier i Sverige som tar emot prov från de regioner som inte har ehcc-diagnostik uppsatt (fig 1).

Provmängden avseende ehcc-diagnostik varierade stort bland de laboratorier med uppsatt diagnostik med mellan 350 till 7600 prover årligen med ehcc-frågeställning.

Figur 1. De tolv laboratorier som inte utför egen ehcc-diagnostik skickar prov med ehcc-frågeställningar vidare till annat laboratorium. Fyra laboratorier tar emot dessa prov.



Kriterier för när ehcc-analys ska utföras

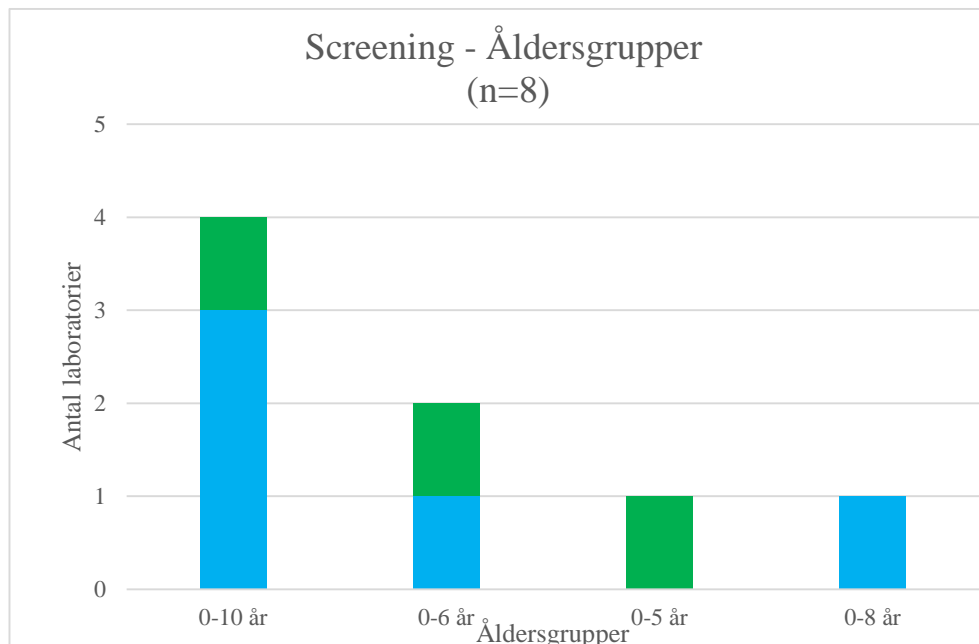
Resterande resultatbeskrivning baserar sig på svaren från 13 laboratorier med ehcc-diagnostik.

För majoriteten av laboratorier ingår inte ehcc som en del av den fecesdiagnostik man rutinemässigt utför såsom det gör för salmonella, yersinia, shigella och campylobacter utan det behöver i någon form indikeras på remissen. Ett kriterium för analys på samtliga laboratorier var exempelvis om det står ”blodig avföring” på remissen och då utfördes alltid analys för ehcc. Dock har ett laboratorium detta som kriterium enbart på barn upp till 12 år.

Under 2015 var andelen anmälda fall av ehcc-infektion för barn under tio år 37 %. Screening av samtliga fecesprov från barn oavsett frågeställning på remissen utfördes vid åtta laboratorier fast utifrån olika ålders- samt säsongskriterier. Inget

gemensamt åldersspann användes men det vanligaste var barn upp till 10 år (fig 2). Utökad screening av barn under sommarhalvåret utfördes vid tre av de åtta laboratorier, men alla laboratorier har valt olika månadsintervall (maj-augusti, maj-september eller juni-september). Övriga kriterier som man angav för analys av ehcc var andra anamnetiska uppgifter som till exempel blodigt prov, blodiga diarréer, HUS, hemolys/anemi, njurpåverkan, trombocytopeni eller fynd av ljusa kolonier på SMAC-agar. Vidare svarade två laboratorier att de har speciella rutiner vid ett utbrott. Vid utbrott utfördes analysen oftare och vidare kriterier för analys användes.

Figur 2. Laboratorier med screening av samtliga fecesprov från barn oavsett frågeställning på remissen utförs vid åtta laboratorier. Blått visar antal laboratorier som utför screening hela året. Grönt visar antal laboratorier som har denna utökade screening enbart under sommarhalvåret. Det åldersspann som var vanligast var 0-10 år.



Metodik för påvisning samt isolering

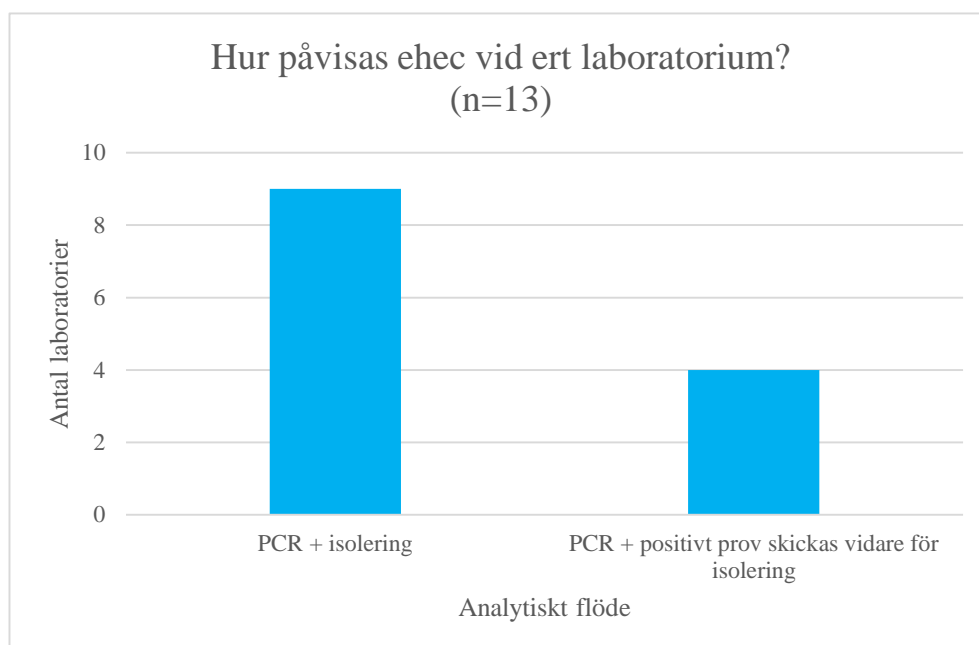
Metodiken som används för påvisning av ehcc var i) odling och PCR (n=11) eller ii) direkt-PCR på feces (n=2). Vid ett av de två laboratorierna med direkt-PCR sattes en odling upp parallellt.

Den första odlingsdelen innefattade olika selektiva plattor och/eller anrikning i buljong över natt. SMAC-agar var den platta som flest laboratorier använde sig av. Tre ytterligare agar-plattor som vissa laboratorier använde sig av var CHROMagar™ STEC, CLED-agar (cystine lactose electrolyte deficient medium) eller blodagar. CHROMagar™ STEC (shiga toxin producing E. coli) inhiberar växt av gram positivabakterier samt har förmågan att selektera inte bara O157 utan även några övriga serogrupper [4]. CLED-agar är mindre selektiv än SMAC-agar och används vanligtvis för urinpatogener [5] och blodagarn är den minst selektiva. Efter detta första anrikningssteg gjordes en PCR-analys för påvisning av

shigatoxingenerna där templetet oftast utgjordes av en slamning från primärstryksdelen från aktuell odlingsplatta.

Det analytiska flödets omfattning skiljde sig vid landets tretton laboratorier som utför ehec-diagnostik. På nio laboratorier utfördes hela flödet, det vill säga detektion av shigatoxingener och isolering av stam. Fyra laboratorier skickade ehec-positiva prover, dvs positiv i PCR, till annat laboratorium för vidare försök till isolering (fig 3). Ingen enhetlighet fanns i förfarandet vid försök till isolering av stam. Några exempel som angavs var; [*x antal kolonier plockas och sammanlagt görs detta tre gånger*], [*10-20 kolonier plockas vid ett tillfälle*], [*enskilda och poolade kolonier plockas vid ett tillfälle*]. När rätt isolat identifierats skickas det till Folkhälsomyndigheten för epidemiologisk typning inom ramen för myndighetens mikrobiella övervakningsprogram [6].

Figur 3. Skillnader i det analytiska flödet vid de tretton laboratorier som har ehec-diagnostik.



Diskussion

Ehec har under de senaste tio åren kommit att bli en av de vanligaste bland de enligt smittskyddslagen anmälningspliktiga bakteriella tarmpatogenerna. Det finns dock stora regionala skillnader. Vad dessa regionala skillnader till fullo beror på är okänt men förutom att det faktiska antalet smittade personer varierar, beror troligtvis också variationen i indikation för provtagning, det vill säga enligt vilka kriterier man utför analysen. Till skillnad från andra tarmpatogener såsom campylobacter, salmonella och yersinia så ingår inte ehec rutinmässigt vid analys vid diarré-utredning vid majoriteten av laboratorerna. I en studie i Jönköpings län har man låtit undersöka konsekvensen av att införa screening för ehec av samtliga barn under tio år som lämnat avföringsprov, men där man inte misstänkt ehec och därmed inte aktivt bett om denna analys [7]. Studien visade att screening tydligt förbättrar ehec-diagnostiken av barn då man hittade lika många ehec-fall bland de patienter där ehec-analys inte hade begärts på remissen som i de fall där det hade begärts.

En annan faktor som också kan påverka är det rent metodologiska. Alla laboratorier som hade ehec-diagnostik hade PCR som första analys för påvisande av shigatoxingenerna. Här varierade däremot vad som användes som templat i PCR-en. Exempelvis kunde först en anrikning av fecesprovet ske över natt och därefter DNA-extraktion och PCR eller PCR på DNA extraherat direkt från fecesprovet, dvs utan anrikning/odling. Majoriteten av svarande laboratorier angav att man satt en specifik gräns som kriterium för när försök till isolering ansågs vara möjlig. Men att dessa första analyssteg är så varierande skulle kunna utgöra en utmaning vid tolkning av om ett isolat är möjligt att få fram ur provet baserat enbart på ett förutbestämt CT-värde (cykeltröskelvärde vid PCR). Hur man försöker isolera påverkar också. Att leta efter ehec är att leta efter E.coli bland andra E.coli i ett fecesprov då de kan ha samma kolonimorfologi. Under senare år har cirka 40 % av alla anmälda fall inte lyckats isoleras och därmed har ingen typ kunnat identifieras. I förlängningen leder det till att eventuella smittspårningar och utbrottutredningar till stor del kan försvåras. Från enkäten framkom exempelvis att flera av landets laboratorier inte använder SMAC-agar vid primärodlingen utan mer icke-selektiva medier vilket kan försvåra påvisningen.

Att prov skickas vidare till annat laboratorium för försök till isolering efter positiv PCR kan i sig påverka hur väl man lyckas isolera. Provmaterialet kan ha påverkats på så sätt att ehec på grund av hanteringen av provet inte längre går att isolera. Det skulle kunna bero på att andra representanter i normalfloran ges möjlighet att växa över ehec i provmaterialet. Om möjligt så borde isoleringsförsök av PCR-positivt ehec-prov så skyndsamt som möjligt utföras utan längre väntan i kyl och eller transporter. Ser man till metodiken så är det enbart två laboratorier i landet som använder direkt-PCR på feces som diagnostisk metod. Troligtvis kommer fler laboratorier övergå till denna metodik framöver.

De önskemål och förväntningar som angavs gällande ehcc-diagnostiken vid Folkhälsomyndigheten var fortsatt stöd vid verifiering av fynd, fortsatt utföra serotypning, stöd vid svårigheter vid isolering, då framför allt vid svårare sjukdom hos barn, information vid införandet av nya metoder samt att ta fram rekommenderad metodik.

Sammanfattningsvis utkristalliserades tre centrala frågeställningar baserat på enkätundersökningens resultat:

- Ska ehcc ingå i det så kallade fecespaketet som används vid gastroenteritutredningar för barn?
- Vad finns det för möjligheter till mer likriktat analysförfarande rent metodologiskt vid laboratorierna?
- Vad finns det för möjligheter till mer likriktade kriterier, dvs screeningsrutiner, för när analys av ehcc ska utföras?

Referenser

1. Falldefinitioner vid anmälan enligt smittskyddslagen. Folkhälsomyndigheten. 2015.
<https://www.folkhalsomyndigheten.se/publicerat-material/publikationer/Falldefinitioner-vid-anmalan-enligt-smittskyddslagen/>
2. Infektion med EHEC/VTEC. Ett nationellt strategidokument. Folkhälsomyndigheten 2015.
<https://www.folkhalsomyndigheten.se/pagefiles/20532/infektion-med-ehcvtec-ett-nationellt-strategidokument-2014-12-17.pdf>
3. Referensmetodik. Enterohemorragiska Escherichia coli-laboratoriediagnostik. Folkhälsomyndigheten.
http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Enterohemorragiska_Escherichia_coli-laboratoriediagnostik
4. Gouali M1, Ruckly C, Carle I, Lejay-Collin M, Weill FX. Evaluation of CHROMagar STEC and STEC O104 chromogenic agar media for detection of Shiga Toxin-producing Escherichia coli in stool specimens. J Clin Microbiol. 2013. Mar;51(3):894-900.
5. Referensmetodik. Urinbilaga 1. Folkhälsomyndigheten.
http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Urin-bilaga_1#4. CLED-agar
6. Mikrobiella och immunologiska övervakningsprogram. Folkhälsomyndigheten. 2016.
<https://www.folkhalsomyndigheten.se/mikrobiologi-laboratorieanalyser/mikrobiella-och-immunologiska-overvakningsprogram/>
7. Andreas Matussek, Ing-Marie Einemo, Anna Jogenfors, et al. Shiga Toxin-Producing Escherichia coli in Diarrheal Stool of Swedish Children: Evaluation of Polymerase Chain Reaction Screening and Duration of Shiga Toxin Shedding. Jnl of Pediatric Infectious Diseases Soc. 2015. Volume 5, Issue 2 Pp. 147-151.

Denna rapport beskriver hur primärdiagnostiken ser ut för ehec vid landets kliniska mikrobiologiska laboratorier. Sammanställningen baseras på en enkätundersökning som genomfördes hösten 2015. Undersökningen genomfördes för att få en enhetlig bild över ehec-diagnostiken.

Cirka hälften av laboratorierna tillhandahöll analyser för påvisning av ehec. Det skiljde sig mellan de olika regionerna avseende vilka kriterier som användes för att ehec-analys skulle utföras. Även analysmetodiken varierade mellan de olika laboratorierna. Dessa skillnader påverkar hur många fall av laboratorieverifierade infektioner av ehec som anmäls inom de olika länen.

Syftet med rapporten är att utgöra ett underlag till Folkhälsomyndigheten och smittskyddsläkare i tolkningen av antalet anmälda fall av ehec.

Folkhälsomyndigheten är en nationell kunskapsmyndighet som arbetar för en bättre folkhälsa. Det gör myndigheten genom att utveckla och stödja samhällets arbete med att främja hälsa, förebygga ohälsa och skydda mot hälsorhot.

Vår vision är en folkhälsa som stärker samhällets utveckling.



Folkhälsomyndigheten

Solna Nobels väg 18, SE-171 82 Solna Östersund Forskarens väg 3, SE-831 40 Östersund.

www.folkhalsomyndigheten.se