Föreningen för Klinisk Mikrobiologis Rekommenderade metoder för Diagnostik av infektioner orsakade av *Shigella*/EIEC

Version 1.0, 2025-12-09

Om rekommendationen

Denna rekommendation har tagits fram då en snabb utveckling av diagnostik för infektioner orsakade av *Shigella*/EIEC har skett de senaste åren. Den grundläggande texten är i hög grad hämtad från relevanta stycken i Referensmetodik för laboratoriediagnostik vid kliniskt mikrobiologiska laboratorier, del 1 tarminfektioner, 2:a upplagan, 2002 (wikiupplaga https://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Referensmetodik:_Tarminfektioner), hämtad i mars 2023). Den tidigare texten har uppdaterats och kompletterats med aspekter som berör PCR och PCR-styrd odling. Denna publikation berör endast diagnostik av *Shigella*/EIEC.

Arbetsgruppen har bestått av representanter från Nationella referenslaboratorier (NRL) för bakteriella tarmpatogener

Christoffer Lindsten, NRL Halmstad
Annika Ljung, kNRL Sahlgrenska Universitetssjukhuset
Inga Fröding, kNRL Folkhälsomyndigheten

Rekommendationen har varit på remiss via Föreningen för klinisk mikrobiologi (FKM) och alla medlemmar i NRL för bakteriella tarmpatogener har godkänt slutversionen.

Huvudbudskap i den nya rekommendationen om diagnostik av *Shigella*/EIEC

- PCR är en känsligare metod än odling för att detektera *Shigella* i faeces.
- PCR kan i nuläget inte skilja mellan *Shigella* och EIEC.
- Selektiv, anpassad, odling kan öka utbytet vid PCR-styrd odling.
- *Shigella* och EIEC ger liknande klinisk bild och båda kan orsaka utbrott.
- Smittskyddsblad och behandlingsrekommendationer för *Shigella* är för närvarande under omarbetning som anpassning till den nya, känsligare diagnostiken.

Innehåll

Om rekommendationen 1

1 Allmänt 3

1.1 Smittämnet 3

1.2 Patogenes och patofysilogi 3

1.3 Symtom och klinisk bild 3

1.4 Epidemiologi 4

2 Rekommenderad metod för diagnostik av *Shigella*/EIEC 4

2.1 Bakgrund 4

2.2 Säkerhetsaspekter 4

2.3 Preanalys 4

2.4 Analys 5

2.4.1 PCR 5

2.4.2 Odling för identifiering av *Shigella* spp. 5

2.5 Postanalys 8

2.5.1 Att tänka på vid införande av PCR-styrd diagnostik 8

2.5.2 Svarskommentar 9

2.6 Smittskyddsanmälan 9

Nyckelreferenser 9

1 Allmänt

1.1 Smittämnet

Shigella är en gramnegativ stav som tillhör familjen Enterobacterales. *Shigella* har, baserat på en kombination av biokemisk profil och specifik agglutination, indelats i fyra olika species, *Shigella dysenteriae* typ 1-15, *S. flexneri* typ 1-7, *S. boydii* typ 1-19 och *S. sonnei*. Gemensam virulensfaktor för alla *Shigella* spp. är en stor plasmid som bl.a. kodar för invasivitetsproteiner. Hos *S. sonnei* sitter även generna för O-antigenet på denna plasmid.

Shigella och *Escherichia coli* kan med DNA/DNA homologistudier inte skiljas från varandra (Rowe & Gross, 1984). De är så lika att de i strikt bemärkelse kan anses tillhöra samma art. Det finns mellan *Shigella* och *E. coli* en ”gråzon” där man finner bakterier med samma virulensplasmid och biokemi som hos *Shigella*, men som inte agglutinerar i *Shigella* antiserum. Det finns också EIEC som bär på virulensplasmiden men som biokemiskt mer liknar en vanlig *E. coli*. Båda dessa varianter betecknas enteroinvasiva *E. coli* (EIEC).

En stor multicenterstudie från 2016–2017 undersökte smittsamhet och symtombild hos patienter med PCR-positiva prover (*ipaH*) där uppföljande analys delat upp grupperna i patienter med odlingspositiva *Shigella*, odlingspositiva EIEC och odlingsnegativa ipaH-positiva prover. Studien undersökte att alla tre grupper hade en liknande klinisk bild, liknande allvarlighetsgrad och liknande smittsamhet och bör därför jämställas både vad gäller falldefinition, smittskyddsåtgärder och behandling (van den Beld, 2019).

Odlingsdiagnostiken med mål att identifiera *Shigella* spp. bedöms dock fortsatt som viktig för att möjliggöra resistensbestämning samt, vid utredning av smittspridning, epidemiologisk typning.

1.2 Patogenes och patofysiologi

Infektionsdosen för *Shigella* kan vara mycket liten, cirka 10–100 bakterier. Virulensen hänger samman med förekomsten av invasivitetsgener som reglerar bildning av medverkande polypeptider. Bakterierna invaderar tjocktarmsmukosans epitelceller där de förökar sig. Detta leder ofta till abscessbildning och nekroser i tarmslemhinnan, blödningar och bildning av pseudomembraner. Under utläkningen kan granulationer utvecklas. Bakterierna invaderar sällan urinvägarna eller blodbanan.

Shigella dysenteriae typ 1 är den enda varianten som bildar ett potent exotoxin, Shigatoxin (stx1), vilket bidrar till virulensen. Toxinet är identiskt med ett toxin som bildas av Enterohemorragisk *E. coli* (EHEC).

1.3 Symtom och klinisk bild

Efter en kort inkubationsperiod (1–2 dygn) debuterar shigellainfektionen med buksmärtor, feber och frekventa vattniga diarréer, som i många fall utvecklas till klassisk bacillär dysenteri med pus, blod

och slem i avföringen. Sjukdomen är hos immunkompetenta personer som regel självbegränsande inom några få dagar. Mycket svåra sjukdomstillstånd ses framför allt med *Shigella dysenteriae*. Efter *Shigella flexneri* infektion ses ibland reaktiva artriter. Kroniskt bärarskap är mycket ovanligt efter behandling men recidiverande infektioner kan förekomma. EIEC-infektion ger en liknande symtombild (van den Beld, M.J.C., 2019).

1.4 Epidemiologi

De flesta fall av shigellainfektioner har smittats utomlands. Den vanligaste arten är *S. sonnei*, följt av *S. flexneri*. *Shigella dysenteriae* är mycket ovanligt fynd i Sverige. Aktuell statistik finns på Folkhälsomyndighetens webbplats.

2 Rekommenderad metod för diagnostik av *Shigella*/EIEC

2.1 Bakgrund

Sedan 2013 pågår en process i landet där allt fler laboratorier går över från odling till PCR för primär påvisning av sjukdomsorsakande bakterier i faeces. En konsekvens av metodbytet från odling till PCR är att en otydlighet uppstått vad gäller påvisning av *Shigella*. PCR-metoder använder *ipaH*-genen som målområde för påvisning. Detta målområde finns också hos enteroinvasiv *E. coli* (EIEC). Det finns i nuläget ingen beskriven PCR-markör som helt specifikt påvisar *Shigella* i faeces. *Shigella* klassas i smittskyddslagen som en allmänfarlig anmälningspliktig sjukdom och till skillnad från övriga akuta bakteriella enteriter har shigellainfektion traditionellt oftast behandlats med antibiotika.

För att kunna skilja mellan EIEC och *Shigella* på PCR-positiva prover, och för att kunna utföra resistensbestämning och epidemiologisk typning, behöver man ha ett framodlat isolat (PCR-styrd odling). Eftersom *Shigella* av olika anledningar är svår att odla, lyckas man endast i runt 20–50 % av fallen isolera *Shigella* spp. i dessa prover, enligt erfarenheter vid svenska laboratorier. Det är sannolikt stor variation mellan laboratorier, och anpassning av utodlingen kan medföra ökat utbyte.

2.2 Säkerhetsaspekter

Infektionsdosen för *Shigella* är mycket låg. Vid allt arbete med levande shigellabakterier eller misstänkt *Shigella* är det därför viktigt att adekvat skyddsutrustning används. Att notera är att *S. dysenteriae* typ 1 tillhör riskklass 3, medan övriga typer tillhör riskklass 2 (AFS 2023:10).

2.3 Preanalys

Tillverkarna av de mest frekvent använda provtagningspinnarna rekommenderar utodling inom 48 timmar. I de fall man först använder PCR och sedan odlar ut positiva prov fördröjs utodlingen med upp till ett dygn. Därför rekommenderas att provet kommer till laboratoriet inom 24 timmar från provtagning. Provet bör förvaras kylt i väntan på analys.

Om proverna riskerar att bli äldre än 48 timmar innan utodling i väntan på PCR, t.ex. vid helg, bör laboratoriet överväga att odla ut alla prover direkt, om ökning av utbytet önskas för att möjliggöra resistensbestämning.

2.4 Analys

2.4.1 PCR

Kommersiella kit för *Shigella* påvisar *ipaH*-genen och kan därmed inte skilja mellan EIEC och *Shigella*. PCR är även betydligt känsligare än odling för påvisning av *Shigella*. PCR-styrd odling rekommenderas för detektion av *Shigella* framför primär odling av denna orsak. Däremot kan användning av kommersiella multiplex-kit innebära nackdelar jämfört med odling för vissa andra tarmpatogena bakterier, tex *Yersinia* spp. En helhetsbedömning bör göras vid val av metod. Följ alltid tillverkarens anvisningar vid analys.

För att kunna skilja mellan *Shigella* och EIEC, utföra resistensbestämning och vid behov epidemiologisk typning måste PCR-positiva prover odlas ut. Eftersom PCR är känsligare än odling kan odlingen behöva anpassas för att öka utbytet (se nedan).

2.4.1.1 PCR som bekräftande metod

Det finns flera publicerade PCR-baserade in-house metoder för att bekräfta förekomst av *Shigella* spp. men ingen av dessa metoder kan helt utesluta *Shigella* spp. i *ipaH*- positiva prov (Kim, 2017). Studier pågår för att försöka utveckla en PCR-metod för att utesluta *Shigella* spp., men hittills finns ingen metod i allmänt bruk, varför isolering av bakteriestam ändå behöver utföras för försök till konventionell typning och resistensbestämning.

2.4.2 Odling för identifiering av *Shigella* spp.

Några bra selektiva medier för anrikning av *Shigella* spp. finns inte i bruk i dag. Däremot är spädning av faecesprov ett sätt att öka chansen att hitta *Shigella* spp. i PCR-positiva prover, se bild 1. Genom att späda faecesprovet och rackla ut spädningar på olika agarplattor ökar chansen att hitta fler friliggande bakteriekolonier än vid traditionell utodling av faeces på agarplatta och möjligheten att hitta en *Shigella*-koloni ökar därmed väsentligt. Proceduren vid spädning och utodling är relativt enkel och tar cirka fem minuter att utföra.

Bild 1. Att späda faeces provet och sedan rackla över hela plattan ger signifikant högre antal friliggande kolonier och resulterar i fler fynd av *Shigella* spp.

2.4.2.1 Förslag på metod för utodling av prover som med PCR blivit positiva för Shigella/EIEC

- Provmaterial
    - Faeces-prov: faeces förs över till ett nytt E-swabrör (E0) med en flockad pinne och löses upp tills det blir ungefär te-färgat
    - Prov i E-swabrör: förspädes inte. (E0) (Om det finns mycket faeces i provet kan det behöva spädas som vid faecesprov.)
- 3st rör med 2 ml steril NaCl (0,9%)-märks upp med exempelvis E1-E3.
- Seriespädning utförs från E0 => E3 där ca 200 µl (andra strecket på pasteurplastpipett) överförs till nästföljande rör.
- Rören vortexas mellan varje steg
- 100 µl från respektive spädningsrör racklas ut på XLD/DC-plattor och inkuberas i luft, 36°C, 1–2 dygn.

Metoden är ett exempel och kan behöva anpassas lokalt beroende på provmaterial/transportmedium och annan laboratorieutrustning.

2.4.2.2 Rekommenderade odlingsmedium

Agar som selekterar fram *Shigella* genom att hämma annan faecesflora, exempelvis XLD agar och/eller DC-agar. *Shigella* spp. växer i allmänhet svagt, och vissa stammar växer inte alls, på selektiva medier.

XLD-agar

Bygger på tre reaktioner: fermentation av xylos, lysin-dekarboxylering och produktion av vätesulfid.

Shigella spp. växer fram inom 1–2 dygn med semiopaka, släta och blanka, färglösa 0,5–2 mm stora kolonier. *Shigella spp.* fermenterar inte kolhydraterna vilket ger basiska produkter med en rödfärgning runt kolonin (framstår röda mot mediets grundfärg). Särskilt *S. sonnei* kan uppvisa variation i kolonimorfologin, råa kolonier med ojämna kanter kan därvid förekomma.

DC-agar

Natriumdesoxycholat hämmar växt av övrig faecesflora förutom *Salmonella* spp., *Shigella* spp. och *Yersinia* spp. Salmonella och Shigella ger ofärgade kolonier och gulfärgning av mediet på grund av oförmåga att fermentera laktos. Salmonella får ofta svart kolonicentrum p.g.a. vätesulfidbildning. Laktosjäsande bakterier ger rödfärgning av mediet.

2.4.2.3 Artbestämning/serogruppering

MALDI-TOF kan inte skilja mellan *Shigella* och EIEC (rapporteras vanligen som *Escherichia coli*) och enstaka EIEC kan agglutinera med Shigella-antisera. Därför behövs biokemiska tester för hjälp

med verifieringen av *Shigella* spp. som exempelvis API20E, Vitek2 eller rörjäsning (Tabell 1) samt agglutination med specifika shigella-antisera. Båda metoderna bör utföras på misstänkta isolat.

2.4.2.3.1 Shigella

Ett isolat som uppfyller följande tre kriterier klassificeras som *Shigella* spp. enligt traditionella metoder:

1. Biokemisk reaktion som är förenlig med *Shigella* spp. (Tabell 1)
2. Positiv agglutination i specifikt shigella-antiserum.
3. Påvisande av virulensplasmiden som bär invasivitetsgener, genom påvisande av *ipaH*-genen.

För rutinmässig verifiering av *Shigella* spp. från kolonier vid odling (primär eller efter initial PCR-positivitet), till aktuell Shigellaserogrupp enligt tabell 1, räcker det att isolatet både har biokemisk reaktion och agglutinerar som *Shigella* (d.v.s. kriterierna 1 och 2 ovan), eftersom sådana isolat i princip alltid även bär virulensplasmiden.

För att minska risken för ospecifika reaktioner, korsreaktioner eller spontanagglutinationer kan agglutinationen utföras efter 2 timmars avdödning genom kokning. Proteinantigener hos *E. coli* som kan orsaka dessa reaktioner förstörs genom kokning. Om agglutination har utförts utan kokning och misstanke om ospecifik reaktivitet föreligger, rekommenderas upprepat test efter kokning.

Tabell 1. Biokemiska referenssubstrat och förväntade resultat efter inkubering i 35–37 °C vid identifiering av Shigella-bakterier

Bakterie	Urea[1]	LD[1]	H2S[1]	VP[2]	Rörlighet[2]	Glukos	Mannit[3]	OD[4]	ONPG[5]	Indol[5]
Shigella sonnei	-	-	-	-	-	+	+/0 gas	+	+	-
Shigella boydii	-	-	-	-	r-	+	+/0 gas	-	+	-
Shigella boydii/flexneri	-	-	-	-	-	+	+/0 gas	-	-	+
Shigella boydii/flexneri, variant	-	-	-	-	-	+	+/0 gas	-	-	-
Shigella dysenteriae	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Shigella dysenteriae, variant 1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Shigella dysenteriae, variant 2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

[1]Positiv reaktion i endera Urea, LD, H2S, VP, oxidas eller rörlighet utesluter genus Shigella.

[2]VP och rörlighetstest utförs i 22 °C.

[3]Mannit utan gas i Durhamrör. Enstaka stammar av *S. boydii* och *S. flexneri* kan jäsa mannit under gasutveckling. Enstaka stammar av *S. flexneri*, *S. boydii* och *S. sonnei* är negativa i mannit.

[4]Enstaka isolat av *S. boydii* och *S. flexneri* kan vara OD-positiva. Enstaka isolat av *S. sonnei* kan vara OD-negativa.

[5]Positiv reaktion i både ONPG och indol utesluter i praktiken genus *Shigella*. Enstaka isolat av *S. sonnei* kan vara ONPG-negativa.

Vid tveksamhet kan isolatet skickas till kompletterande nationellt referenslaboratorium för bakteriella tarmpatogener vid Folkhälsomyndigheten (kNRL Fohm) för konfirmation.

2.4.2.3.2 EIEC

EIEC behöver ur smittskyddssynpunkt inte isoleras eller svaras ut, men vissa misstänkta isolat som skickas till referenslaboratoriet visar sig istället vara EIEC och beskrivs därför här. Ett isolat som uppfyller följande fyra kriterier enligt klassificeras enligt traditionell metod som EIEC:

1. Isolatet har artbestämts till *E. coli/Shigella*.
2. Biokemisk reaktion som **inte** är förenlig med *Shigella* (Tabell 1).
3. **Ingen** agglutination i specifikt Shigella – antisera.
4. Påvisande av virulensplasmiden som bär invasivitetsgener, genom påvisande av *ipaH*-genen.

2.4.2.3.3 Svårbedömda *Shigella*/EIEC

Isolat som har påvisad *ipaH*-gen och/eller kolonimorfologi som väcker misstanke om Shigella samt har biokemisk reaktion som är förenlig med *Shigella,* men som inte agglutinerar i specifikt antiserum eller det omvända är svårbedömda och bör utredas på referenslaboratorium (kNRL Fohm). Dessa kan utgöra nya serogrupper av *Shigella* och kan efter utredning bedömas som *Shigella species* (ej typbar).

2.4.2.4 Helgenomsekvensering av *Shigella*/EIEC.

Helgenomsekvensering är ett bra alternativ till traditionella typningsmetoder med biokemi och agglutination, och används numera vid Folkhälsomyndigheten för verifiering och serotypning. Verktyget ShigaTyper (Wu, Y., 2019) kan användas för att påvisa *ipaH*-genen och utföra *in silico* serotypning samt avgöra om ett isolat är *Shigella* eller EIEC. Typningen av tidigare otypbara isolat förbättras med ShigaTyper och helgenomsekvensering innebär samtidigt möjlighet till släktskapsanalys som stöd i smittspårning och tolkning av typningsresultat.

2.5 Postanalys

2.5.1 Att tänka på vid införande av PCR-styrd diagnostik

Vid övergång från odlingsbaserad till PCR-styrd diagnostik är det lämpligt att ha en dialog med berörd infektionsklinik och smittskyddsenhet om metodändringen. Detta eftersom metodändringen till en känsligare metod kommer medföra att betydligt fler fall diagnosticeras, vilket innebär fler smittspårningsärenden och påverkan på tolkning av fynd av vikt för smittskyddsarbete och behandlande läkare samt även en påverkan på nationell statistik. Formulering av analysresultat i svaret bör ske på ett sätt så att det blir tydligt för svarsmottagaren vad resultatet innebär och om isoleringsförsök pågår eller har avslutats. kNRL för bakteriella tarmpatogener vid Fohm tar också gärna emot information om metodförändringar.

2.5.2 Svarskommentar

Det är bra att föra en diskussion med det lokala smittskyddet om lämplig formulering av svarskommentarer, som kan utformas på olika sätt. Följande exempel på svarskommentarer kan användas som inspiration (baserade på 2025 års falldefinitioner, kan behöva justeras vid uppdaterade falldefinitioner).

1. Preliminärsvar, Shigella/EIEC PCR positiv, odling pågår.
Shigella/EIEC DNA påvisat med PCR. Metoden kan inte skilja mellan Shigella och Enteroinvasiv *E. coli* (EIEC). Odling pågår. Fyndet är anmälningspliktigt enligt smittskyddslagen, se aktuell falldefinition.

2. Slutsvar Shigella/EIEC PCR-positiv, odlingsnegativ.
Shigella/EIEC DNA påvisat med PCR. Odling har inte påvisat *Shigella* spp. PCR-metoden kan inte skilja mellan Shigella och Enteroinvasiv *E.coli* (EIEC). Fyndet är fortsatt anmälningspliktigt enligt smittskyddslagen, se aktuell falldefinition.

3. Slutsvar PCR-positiv Shigella /EIEC, odlingspositiv.
Shigella xxxx isolerad (artbestämning svaras). Påvisad med PCR och odling. Fyndet är anmälningspliktigt enligt smittskyddslagen, se aktuell falldefinition.

2.6 Smittskyddsanmälan

Shigellainfektion är en anmälningspliktig sjukdom. Aktuella falldefinitioner för smittskyddsanmälan publiceras på Folkhälsomyndighetens webbplats.

Nyckelreferenser

Escher, M., et al., A severe foodborne outbreak of diarrhoea linked to a canteen in Italy caused by enteroinvasive Escherichia coli, an uncommon agent. Epidemiol Infect, 2014. 142(12): p. 2559-66.

Hendriks, A.C.A., et al., Genome-wide association studies of Shigella spp. and Enteroinvasive Escherichia coli isolates demonstrate an absence of genetic markers for prediction of disease severity. BMC Genomics, 2020. 21(1): p. 138.

Houng, H.S., O. Sethabutr, and P. Echeverria, A simple polymerase chain reaction technique to detect and differentiate Shigella and enteroinvasive Escherichia coli in human feces. Diagn Microbiol Infect Dis, 1997. 28(1): p. 19-25.

Kim, H.J., et al., Multiplex Polymerase Chain Reaction for Identification of Shigellae and Four Shigella Species Using Novel Genetic Markers Screened by Comparative Genomics. Foodborne Pathog Dis, 2017. 14(7): p. 400-406.

Lagerqvist, N., et al., Outbreak of gastroenteritis highlighting the diagnostic and epidemiological challenges of enteroinvasive Escherichia coli, County of Halland, Sweden, November 2017. Euro Surveill, 2020. 25(9).

Lindsten, C., et al. Improved diagnostics of Shigella by Shigella-specific PCR and modified culture technique. Abstract P0992, in The 32nd ECCMID conference. 2022: Lissabon.

Newitt, S., et al., Two Linked Enteroinvasive Escherichia coli Outbreaks, Nottingham, UK, June 2014. Emerg Infect Dis, 2016. 22(7): p. 1178-84.

Torpdahl M., et al. Imported spring onions related to the first recorded outbreak of enteroinvasive Escherichia coli in Denmark, November to December 2021. Euro Surveill. 2023 Apr;28(15):2200572.

van den Beld, M.J. and F.A. Reubsaet, Differentiation between Shigella, enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) and noninvasive Escherichia coli. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012. 31(6): p. 899-904.

van den Beld, M.J.C., et al., Evaluation of a Culture-Dependent Algorithm and a Molecular Algorithm for Identification of Shigella spp., Escherichia coli, and Enteroinvasive E. coli. J Clin Microbiol, 2018. 56(10).

van den Beld, M.J.C., et al., Multicenter evaluation of molecular and culture-dependent diagnostics for Shigella species and Entero-invasive Escherichia coli in the Netherlands. J Microbiol Methods, 2016. 131: p. 10-15.

van den Beld, M.J.C., et al., A Multifactorial Approach for Surveillance of Shigella spp. and Entero-Invasive Escherichia coli Is Important for Detecting (Inter)national Clusters. Front Microbiol, 2020. 11: p. 564103.

van den Beld, M.J.C., et al., Incidence, clinical implications and impact on public health of infections with Shigella spp. and entero-invasive Escherichia coli (EIEC): results of a multicenter cross-sectional study in the Netherlands during 2016-2017. BMC Infect Dis, 2019. 19(1): p. 1037.

Wu, Y., et al., In Silico Serotyping Based on Whole-Genome Sequencing Improves the Accuracy of Shigella Identification. Appl Environ Microbiol. 2019 Mar 22;85(7):e00165-19. Yassine, I., et al., Population structure analysis and laboratory monitoring of Shigella by core-genome multilocus sequence typing. Nat Commun. 2022 Jan 27;13(1):551.