

NATIONAAL REFERENTIE CENTRUM SHIGELLA

Jaarverslag 2023

—

Sciensano
Infectieziekten mens - Bacteriële ziekten
NRC Shigella

Juli 2024 • Brussel • België

MATTHEUS, WESLEY

•

CEYSSENS, PIETER-JAN

•

VAN DEN BOSSCHE, AN

Wesley Mattheus, Ph.D. • T+32 (0)2 373 32 24 • wesley.mattheus@siensano.be

Met de financiële steun van



Flanders
State of the art



Gelieve te citeren als: Nationaal Referentie Centrum voor Salmonella en Shigella, Jaarverslag 2023. Sciensano, Brussel, België.

Dankbetuigingen

We betuigen onze dank aan de gezondheidsinspecteurs die de enquêtes bij de patiënten uitvoeren, alsook aan de klinische laboratoria, die door het sturen van hun stammen, meewerken aan het toezicht op deze pathogenen. We bedanken eveneens het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (FAVV).

HOOFDPUNTEN

- In 2023 typeerde het NRC *Shigella* 515 unieke *Shigella* stammen, een **stijging met 68%** ten opzichte van het post-pandemiejaar 2022, waarbij een recordaantal stammen werd bereikt. In vergelijking met het vijfjarig gemiddelde (incl. pandemie) was er een uitgesproken verhoging van het aantal shigellozen in de tweede jaarhelft van 2023.
- Het onderscheid tussen *Shigella* and *E. coli* infecties blijft moeilijk voor de klinische laboratoria, hoewel verbetering zichtbaar is, vermoedelijk door de introductie van moleculaire panelen. In 2023 waren 13,6% van alle toegezonden stalen geen *Shigella* spp., maar commensale *E. coli*.
- Net zoals in de voorbije jaren, vond men in 2023 de hoogste incidentie van shigellozen terug bij mannen tussen 25 en 44 jaar. In 2023 was er een lichte daling van de proportie stalen afkomstig van mannelijke patiënten (**M/V ratio van 1,43** tov. 1,64 in 2022).

Terwijl in 2020 het aantal *S. sonnei* isolaten daalde naar 52, vertegenwoordigde ***S. sonnei*** dit jaar **78%** (401/515) van het totale aantal shigellozen in België, hetgeen een recordniveau is voor dit species. Opvallend genoeg, en in tegenstelling tot *S. sonnei*, werden de absolute staalaantallen van *S. flexneri* nauwelijks beïnvloed door de maatregelen rond COVID-19. Ook post-pandemisch blijven deze aantallen stabiel, waardoor proportioneel de prevalentie van de *S. flexneri* serotypen uiteraard wel daalt. De meest prevelante serotypen blijven *S. flexneri* 2a (7,8% ten opzichte van 14.1% in 2021, en 7.5% in 2019) en *S. flexneri* 1b (4,7% tov. 8.1% in 2021).

- Sinds 2023 worden **alle bevestigde *Shigella* spp. prospectief geanalyseerd met WGS**, waardoor de verschillende klonale groepen in detail kunnen worden opgevolgd. Er werden 14 clusters (gedefinieerd als >4 isolaten met <8 allelen verschil binnen een tijdspanne van 6 maanden) gedetecteerd en opgevolgd (Tabel 3). Het NRC onderzocht onder andere 4 internationale clusters

van XDR *S. sonnei* en *S. flexneri* 2a gerelateerd aan homoseksuele mannen, en een ernstige spill-over uitbraak van *S. sonnei* in een restaurant in West-Vlaanderen in September.

- In 2023 werden 73 gevallen (14,2%) gemeld als reisgerelateerd, een verdrievoudiging in vergelijking met 2021 waarbij het pre-coronaniveau (16.8% in 2019) opnieuw werd bereikt. Van deze reisgebonden stalen was 27% afkomstig uit Marokko.
- In 2023 waren 39% van de *Shigella* stammen multidrug resistent (resistentie tegen meer dan 3 klassen van antibiotica). Hoewel dit stabiel is tov. vorig jaar, is een duidelijke trend naar MDR zichtbaar. Ter vergelijking, in 2016 bedroeg het aantal MDR *Shigella* stammen nog maar 13.1%.
- Een zeer opvallende vaststelling bij ***S. sonnei*** is de sterke toename van **resistentie tegen indicator-antibiotica voor ESBL productie (cefotaxime en/of ceftazidime)**, van 15% pre-pandemie tot **43%** in 2023. Deze stijging is voornamelijk te wijten aan hoge circulatie van plasmide-gecodeerde *bla*_{CTX-M-15} (n=138) en *bla*_{CTX-M-27} (n=35) genen in specifieke uitbraakstammen. Deze stammen dragen ook de *qnrB19* en *mphA* genen, respectievelijk leidend tot resistentie tegen ciprofloxacine en macroliden.
- Het resistentiepatroon van *S. flexneri* wordt gekenmerkt door hoge en toenemende resistentie tegen de oude antibiotica ampicilline, chloramfenicol, cotrimoxazole en tetracycline. Resistentie tegen azithromycine nam de voorbije jaren sterk toe, maar daalde in 2023 in *S. flexneri* 1b (50%), 2a (37,8%), en *S. flexneri* 3a/b (69%). Ciprofloxacine resistentie is enkel een probleem in *S. flexneri* 2a, waar in 2023 een recordhoogte (78,4%) werd gemeten. Opvallend was ook het stijgende niveau in resistentie tegen 3^{de} generatie cephalosporines, zowel in *S. flexneri* 1b (31,8%) als in 2a (27%).
- Er was geen of nagenoeg geen ongevoeligheid tegen gentamicine, colistine en de carbapenems.
- Het NRC publiceerde in 2023 **twee peer-reviewed artikels**.

INHOUDSTAFEL

● 1. INLEIDING	5
1.1. Doelstelling	5
1.2. Kwaliteit	5
● 2. METHODOLOGIE	6
2.1 Definitie	6
2.2 Verzamelen van stammen en metadata	6
2.3 Taxonomie	6
2.4 workflow	6
2.5 Antibioticumresistentie	6
2.6 Whole-genome sequencing	7
● 3. RESULTATEN	8
3.1 Staalcollectie: aantal en specimen	8
3.2 Leeftijds- en genderdistributie	8
3.3. Species en Serovar distributie	8
3.4. Geografische spreiding en uitbraken	9
3.5. Reisgerelateerde infecties	11
3.6. Antibioticumresistentie	11
● 4. RESEARCH & DEVELOPMENT (ENG)	13
4.1 Peer-reviewed publications (2023)	13

1. INLEIDING

1.1. DOELSTELLING

De belangrijkste opdracht van het Nationaal Referentiecentrum voor *Shigella* (NRCS) is het verzekeren van een epidemiologisch toezicht op humane infecties van *Shigella*. Dit toezicht heeft als doel zo snel mogelijk epidemieën te detecteren, alsook hun oorsprong en op lange termijn de ruimtelijke en tijdelijke tendensen in de evolutie van deze kiem te evalueren. Sinds 2023 worden *Shigella* spp. prospectief opgevolgd via Whole-Genome Sequencing (WGS). Het NRCS houdt eveneens toezicht op de antibiotica-gevoeligheid van de geïsoleerde kiemen.

Wanneer er een epidemie vermoed wordt, waarschuwt het NRC de gezondheidsinspecteurs van de drie regio's (AVIQ, Departement Zorg & Gezondheid en Vivalis.Brussels) die vervolgens het nodige doen om een onderzoek in te stellen bij de patiënten. Dit toezicht laat toe epidemieën te controleren, preventiemaatregelen uit te stippelen en maatregelen te nemen/bepalen ten gunste van de volksgezondheid.

Maandelijks wordt alle subtyperingsdata overgebracht naar het nationale EpiStat surveillance systeem, en jaarlijks doorgestuurd naar het Europese netwerk van Food and Waterborne Diseases and Zoonoses (een organisatie voor enterische infecties van het European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC). Deze epidemiologische gegevens zijn te raadplegen door de gezondheidsinspecteurs van de Gemeenschappen, het netwerk van de peillaboratoria en de referentiecentra via <https://www.sciensano.be/en/national-reference-centers-human-microbiologyen> en <https://epistat.sciensano.be/pro/analytcs.aspx>. De algemene tendensen zijn publiek beschikbaar via <https://epistat.sciensano.be/dashboard/>.

1.2. KWALITEIT

Sinds meer dan 40 jaar streeft het NRC een hoge kwaliteitsstandaard na, zowel op het vlak van de analyses en de epidemiologische studies als op het vlak van communicatie met de correspondenten en opdrachtgevers.

In 2003 heeft het Centrum een officieel kwaliteitssysteem, NBN en ISO/IEC 17025, geïntroduceerd om de kwaliteitsstandaard te officialiseren en sinds 22 juni 2004 is het centrum geaccrediteerd. De moleculaire typerings- en sub-typeringstechnieken zijn sinds juni 2013 geaccrediteerd volgens de ISO15189 norm.

Dit systeem garandeert de nauwkeurigheid en geldigheid van de toegepaste protocollen, de traceerbaarheid van de onderzoeksresultaten, de juistheid van de uitslagen en de technische onafhankelijkheid van het laboratorium. Dit kwaliteitssysteem scheidt eveneens een band van vertrouwen tussen het Centrum en zijn correspondenten en klanten dankzij de kwaliteit van de uitgevoerde analyses.

Behalve de invoering van dit officiële kwaliteitssysteem zet het NRC ook actief in op het introduceren van moleculair biologische technieken, zoals Next-Generation Sequencing en multiplex typeringen. Deze laten het NRC toe zijn deskundigheid in nationale en internationale opdrachten in het kader van de volksgezondheid en de bescherming van de consument te verzekeren en uit te voeren.

2. METHODOLOGIE

2.1 DEFINITIE

Een shigellose wordt gedefinieerd als een humane infectie waarbij een *Shigella* stam geïsoleerd wordt.

2.2 VERZAMELEN VAN STAMMEN EN METADATA

Isolaten van *Shigella* worden door klinische laboratoria op vrijwillige basis opgestuurd naar het NRC, samen met het formulier met inlichtingen over de stam en de epidemiologie.

De gevraagde metadata bevatten de leeftijd, geslacht en postcode van de patiënt, samen met het geassocieerd ziektebeeld en informatie i.v.m. recente reizen en hospitalisatie van de patiënt. Indien er al vastgestelde antigeenkenmerken zijn, worden deze ook gevraagd. In geval van een epidemie of collectieve voedselintoxicatie moeten slechts enkele stammen van verschillende patiënten opgestuurd worden met de vermelding van het totaal aantal vastgestelde gevallen.

Na ontvangst krijgt elk staal een uniek nummer in de vorm S23BD0000x, en wordt de opgenomen metadata digitaal ingebracht in het STARLIMS systeem. Het staal wordt na analyse bewaard in 20% glycerol op -80°C.

In Vlaanderen worden shigellosen via het NRC gerapporteerd aan de gezondheidsinspecteurs, in tegenstelling tot in Wallonië en Brussel.

2.3 TAXONOMIE

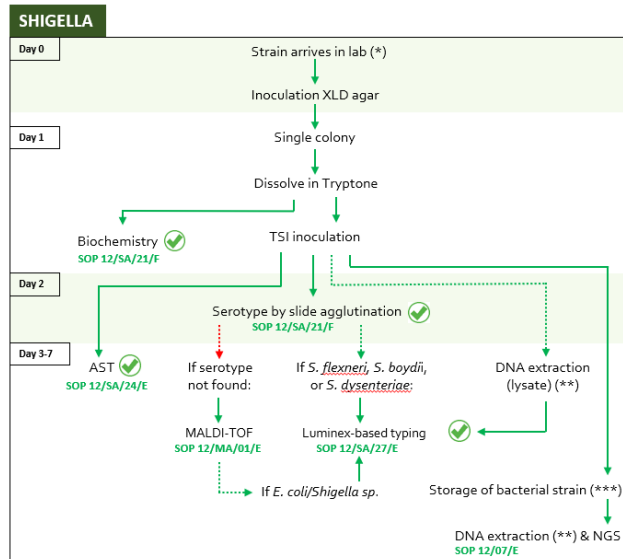
Het genus *Shigella* behoort tot de familie van de *Enterobacteriaceae* en bevat vier species: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* en *S. sonnei*. De identificatie van deze 4 species is gebaseerd op biochemische eigenschappen en antigeen-kenmerken.

Ieder species is onderverdeeld in serovars op basis van een karakteristieke O-factor; deze serovars worden aangeduid door Arabische cijfers (soms gevolgd door een letter of simpelweg door een letter bij sommige varianten van *S. flexneri*).

2.4 WORKFLOW

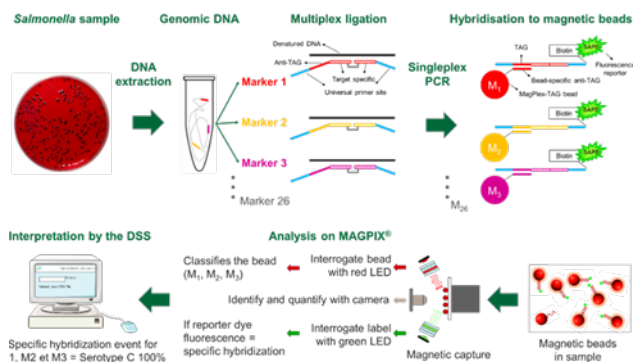
De workflow van het NRC Shigella wordt schematisch weergegeven in Figuur 1. Na opzuivering van de stam op XLD agar, wordt het serotype van de stam geïdentificeerd met Triple Sugar Iron Agar (TSI, Biotrading, NL) agglutinatie van de somatische O-antigenen, gebruik makend van

commercieel beschikbare monovalente antisera (Denka Seiken CO, UK). Ook wordt de mobiliteit van de stam gecontroleerd.



Figuur 1. Workflow in het NRC Shigella, 2023. Testresultaten met een vinkje worden gecommuniceerd naar het indienende labo. AST, antibioticum susceptibiliteitstest; WGS, whole-genome sequencing.

Om onderscheid te kunnen maken tussen *Shigella* spp. en enteroinvasieve *E. coli*, heeft het NRC een multiplex test ontwikkeld op basis van Luminex xTAG beads (Figuur 2)¹, waarbij specifieke genetische markers worden onderzocht die toelaten dit onderscheid te maken. Deze methode is eveneens in staat *sonnei* en *flexneri* serotypen te onderscheiden. Sinds 2022 is deze test geaccrediteerd door BELAC.



Figuur 2. Schematische weergave van de Luminex-gebaseerde multiplex. Voor een exacte weergave van de probes en doelwitten verwijzen we naar Ventola et al.¹.

2.5 ANTIBIOTICUMRESISTENTIE

Het NRC test de antibioticagevoeligheid van alle bevestigde *Shigella* stammen. Sinds 2017 wordt het antibiogram opgesteld door broth microdilutie (Sensititre™, Thermo Fisher), waarbij de Minimale Inhibitorische Concentratie (MIC) waarde voor elk antibioticum wordt bepaald en

¹ Ventola et al. (2019), Microbiologyopen. 8(8):e00807.

worden geïnterpreteerd met EUCAST Clinical Breakpoint Table v.13.0 (Tabel 1) which was valid in 2023.

Tabel 1. Antibiotica getest via broth microdilutie.

Antibioticum	CODE	Geteste conc. (mg/L)	Gevoeligheids-breekpunt (mg/L) ^{1,3}
AMPICILLINE IV	AMP	1-64	8.0
AZYTHROMYCINE ²	AZI	2-64	ND
CEFOTAXIME	FOT	0.25-4	1.0
CEFTAZIDIME	TAZ	0.5-8	1.0
CHLORAMPHENICOL	CHL	8-64	ND
CIPROFLOXACINE	CIP	0.015-8	0.25
COLISTINE	COL	0.5-8	(2.0)
ERTAPENEM	ETP	0.015-2	0.5
GENTAMICINE	GEN	0.5-16	(2.0)
MEROPENEM	MER	0.03-16	2.0
SULFAMETHOXAZOLE	SMX	32-1024	ND
TETRACYCLINE	TCY	2-64	ND
TIGECYCLINE	TGC	0.25-8	ND
TRIMETHOPRIM	TMP	0.5-16	4.0

¹ ND, not determined

² Azitromycine is gebruikt bij de behandeling van darminfecties, voornamelijk bij *Shigella*-soorten en *Salmonella Typhi*. Hoewel de wild-type verdeling enigszins kan variëren, is het waarschijnlijk dat isolaten met MIC's boven 16 µg/mL een azitromycine-resistentiemechanisme hebben.

³ In overeenstemming met EUCAST moeten de resultaten bij niet-resistente stammen voor aminoglycosiden en colistine tussen haakjes worden gezet. De volgende opmerkingen moeten aan het verslag worden toegevoegd: "dit antibioticum mag niet als monotherapie voor systemische infecties worden gebruikt zonder aanvullende therapeutische maatregelen".

In dit rapport wordt multidrugresistentie (MDR) gedefinieerd als resistent tegen meer dan drie klassen antibiotica.

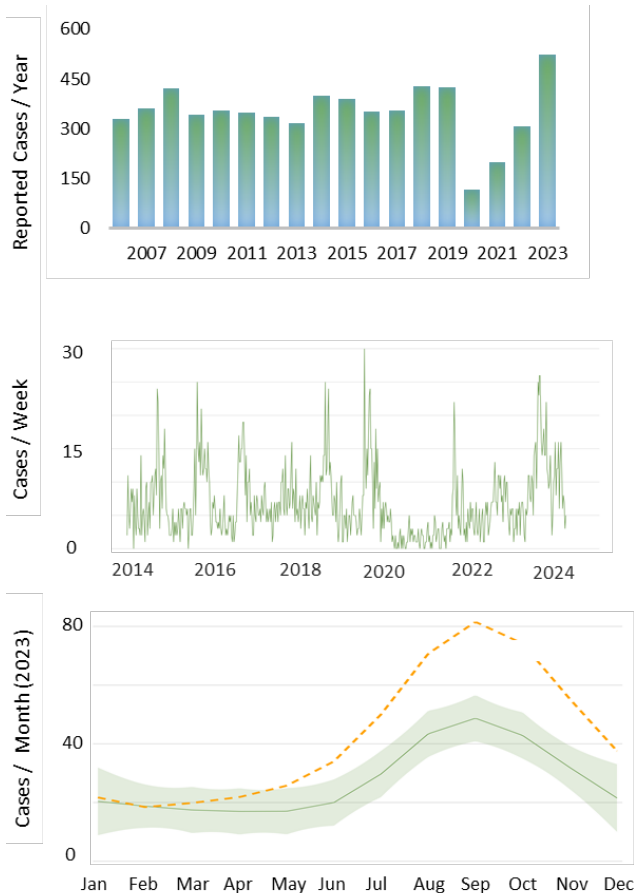
2.6 WHOLE-GENOME SEQUENCING

Sinds 2023 worden *Shigella* stammen prospectief verder onderzocht met behulp van Next-Generation Sequencing (NGS). In dit geval wordt genomisch DNA geëxtraheerd met de MgC Bacterial DNA Kit™ met 200 µl elutie volume (Atrida, NL), volgens instructies van de fabrikant. Sequencing libraries worden gemaakt met de Illumina Nextera XT DNA sample preparation kit, en vervolgens gesequeneerd met een Illumina MiSeq instrument met een 250-bp paired-end protocol (MiSeq v3 chemistry), volgens instructies van de fabrikant. Een gedetailleerde beschrijving van de *in silico* workflow voor *Shigella* is beschreven in Bogaerts B., *et al.* (2021) *Microorganisms* 9,767. Phylogenetische clustering wordt uitgevoerd in BioNumerics 8.1, en geografische spreiding gevisualiseerd met MicroReact.

3. RESULTATEN

3.1 STAALCOLLECTIE: AANTAL EN SPECIMEN

Het voorbije jaar typeerde het NRC *Shigella* isolaten in opdracht van 91 klinische laboratoria. Uit deze stalen identificeerde het NRC **515 unieke *Shigella* stammen**, een **stijging met 68%** ten opzichte van het post-pandemiejaar 2022, waarbij een recordaantal submissions bereikt werd (Figuur 3). Zoals weergegeven in Figuur 3, werd tussen de start van de eerste lockdown (maart 2020) en augustus 2021 een scherpe afname van het aantal Shigellosen vastgesteld. In vergelijking met het vijfjarig gemiddelde (incl. pandemie) was er een uitgesproken verhoging van het aantal shigellosen in de tweede jaarhelft van 2023 (Figuur 3, midden en onder).



Figuur 3. Boven: Totaal aantal bevestigde *Shigella* spp. onderzocht aan het NRC, weergegeven per jaar voor de periode 2006-2023. Midden: Overzicht van de wekelijks gerapporteerde Shigellosen in de periode 2014-2023. Onder: Overzicht van de maandelijks gerapporteerde Shigellosen in 2023 (oranje), in vergelijking met het vijfjarig gemiddelde (groen).

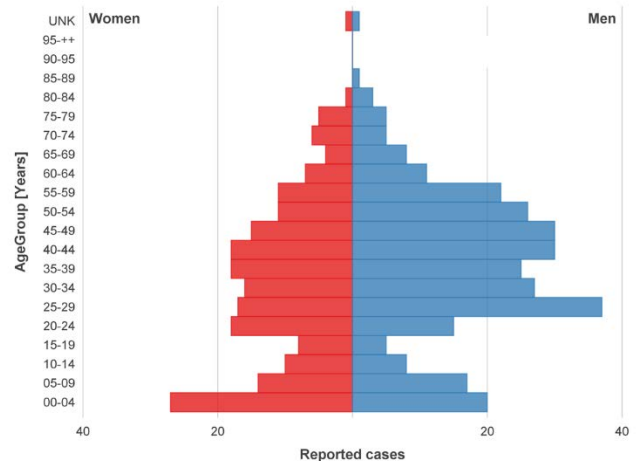
Van de 601 stammen die in totaal werden ontvangen ter typering, toonden biochemische en moleculaire testen

(Kligler-Hajna, urease, MALDI-TOF) en/of afwezigheid van agglutinatie bij serotypering aan dat **13,6%** (82/601) **geen *Shigella* spp.** betrof, hetgeen een lagere proportie valse positieven is in vergelijking met 2022 (19,6%). Met een nieuw ontwikkelde Luminex multiplex methode, die in 2022 BELAC accreditatie ontving, werd vastgesteld dat de meerderheid van deze stammen **niet-enteroïnvastieve *E. coli*** stammen waren.

Van de ontvangen stammen vertoonde 0,5% geen groei meer. De grote meerderheid van de bevestigde *Shigella* stammen (510/515, **99%**) werden geïsoleerd uit **faeces**, hoewel er ook één stammen geïsoleerd werd uit bloed (0,2%). Voor 4/515 van de stammen was het specimen onbekend.

3.2 LEEFTIJD- EN GENDERDISTRIBUTIE

Net zoals in de voorbije jaren, vond men in 2023 de hoogste incidentie van shigellosen terug bij mannen tussen 25 en 44 jaar (Figuur 4). In 2023 was er een lichte daling van de proportie stalen afkomstig van mannelijke patiënten (**M/V ratio van 1,43** tov. 1,64 in 2022 en 1,9 in 2021). Zoals blijkt uit Figuur 4, wordt deze M/V discrepantie volledig bepaald door de overrepresentatie van stammen uit volwassen mannen tussen 20 en 59 jaar.



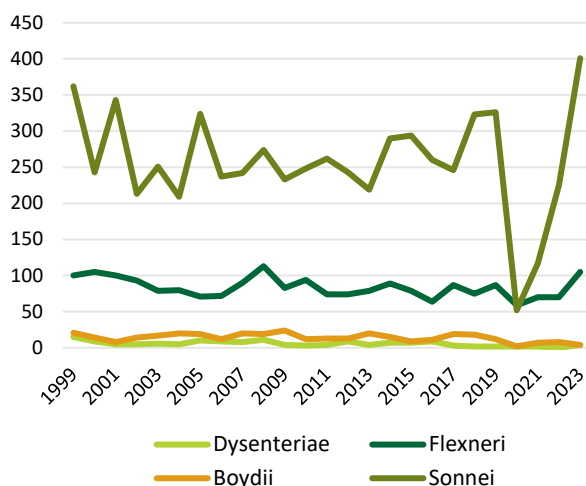
Figuur 4. Leeftijdspiramide gegenereerd voor de bevestigde *Shigella* infecties, periode 2023.

3.3. SPECIES EN SEROVAR DISTRIBUTIE

De proportie van de verschillende *Shigella* spp. wordt samengevat in Tabel 2 en Figuur 5. Zoals geïllustreerd wordt in Figuur 5, was de distributie van *Shigella* species al meer dan twee decennia bijzonder stabiel in België. In 2020 daalde het aantal *S. sonnei* echter scherp naar slechts 52 stammen. De verklaring hiervoor ligt vermoedelijk deels bij

het reisgebonden karakter, en deels bij de seksuele transmissie van dit pathogeen. Vanaf september 2021 nam het aantal *S. sonnei* infecties opnieuw toe, deels door nieuwe internationale uitbraken onder homoseksuele mannen (MSM), en deels door het opheffen van de Covid restricties. In 2023 bereikte *S. sonnei* infecties een recordhoogte, en vertegenwoordigden ze **77,8%** (401/515) van het totale aantal shigellosen in België.

Het aantal *S. boydii* stammen, typisch geassocieerd met reizen naar Indië, was laag (0,7%, 4/515), net zoals het aantal *S. dysenteriae* isolaten (0,7%, 4/515).



Figuur 5. Evolutie van het absolute aantal unieke *Shigella* stammen geanalyseerd aan het NRC, volgens species, periode 1999-2023.

Een opvallende vaststelling tijdens de pandemie was dat de prevalentie van *S. flexneri* (20,3%, 105/515) veel minder afhankelijk was van de Covid maatregelen (Figuur 5, Tabel 2), waarbij de absolute aantallen min of meer op pre-pandemie niveau bleven. Ook post-pandemisch blijven deze aantallen stabiel, waardoor proportioneel de prevalentie van de *S. flexneri* serotypen uiteraard wel daalt. De meest prevelante serotypen blijven *S. flexneri* 2a (7,8% ten opzichte van 14.1% in 2021, en 7.5% in 2019) en *S. flexneri* 1b (4,7% tov. 8.1% in 2021).

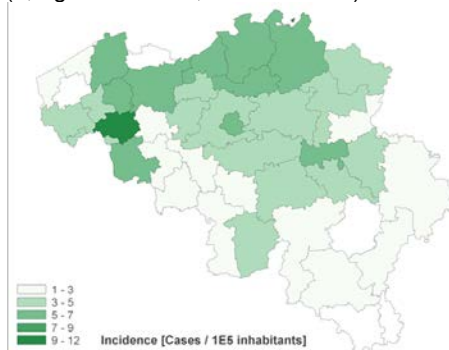
Tabel 2. Overzicht van de verschillende geïdentificeerde serotypen aan het NRC (2021-2023).

Serotype	2021		2022		2023	
	N	%	N	%	N	%
Sonnei	117	59,1	225	73,3	401	77,8
2a	28	14,1	19	6,2	40	7,8
1b	16	8,1	17	5,5	24	4,7
3b	11	5,5	9	2,9	8	1,6
6	5	2,5	7	2,3	9	1,7
3a	4	2,0	3	1,0	8	1,6
4	1	0,5	5	1,6	2	0,4
Y	1	0,5	0	0,0	1	0,2

Flexneri	5	1	0,5	0	0,0	1	0,2
	1A	0	0,0	1	0,3	0	0,0
	1	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	7	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	2b	0	0,0	0	0,0	2	0,4
	4a	0	0,0	0	0,0	1	0,2
	x	0	0,0	1	0,3	0	0,0
UNK	3	1,5	8	2,6	5	1,0	
Boydii	2	1	0,5	3	1,0	1	0,2
	4	1	0,5	3	1,0	1	0,2
	5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	8	1	0,5	0	0,0	0	0,0
	9	0	0,0	0	0,0	1	0,2
	10	0	0,0	0	0,0	1	0,2
	11	1	0,5	1	0,3	0	0,0
	12	1	0,5	0	0,0	0	0,0
	14	1	0,5	0	0,0	0	0,0
	17	1	0,5	0	0,0	0	0,0
	UNK	0	0,0	1	0,3	0	0,0
Dysenteriae	1	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	2	0	0,0	0	0,0	1	0,2
	4	1	0,5	0	0,0	1	0,2
	7	0	0,0	0	0,0	1	0,2
12	1	0,5	0	0,0	1	0,2	
Untypable					1	0,2	
TOTAL					515	100	

3.4. GEOGRAFISCHE SPREIDING EN UITBRAKEN

Een overzicht van de geografische spreiding van de humane Shigellosen is weergegeven in Figuur 6. In 2023 was de meerderheid van de stammen (63,9%) afkomstig uit Vlaanderen; Waalse en Brusselse patiënten zorgden voor 19,2% en 12,2% van de stammen, respectievelijk. Voor 24 stammen (4,6%) was er geen informatie over de woonplaats. Deze verdeling over de regio's is gelijkaardig in vergelijking met de voorbije jaren. Bekeken per arrondissement werden in 2023 de hoogste incidenties gemeten in **Kortrijk** (11,9 gevallen/100,000 bewoners), **Antwerpen** 6,8 gevallen/100,000 bewoners) en **Brugge** (6,4 gevallen /100,000 bewoners).



Figuur 6. Incidentie van het totaal aantal humane *Shigella* infecties per arrondissement (2023), op basis van het aantal gevallen bevestigd door het NRCS. Weergegeven per 100,000 inwoners.

Tabel 3. Overzicht van *Shigella* clusters in 2023.

Cluster ¹	EPIS ²	MSM ³	Travel	Isolates ⁴	AMR ⁵			
					CSP	CIP	AZM	Cotrim
Sonnei_2020_alpha	ARH-00002 / 2023-EIP-00023	YES	Capo Verde Tunesia	92	Red	Red	Red	Red
sonnei_2022_alpha	2022-FWD-00088	NO		11	Green	Green	Green	Green
Sonnei_2022_beta	2022-FWD-00092	NO		18	Red	Red	Red	Red
Sonnei_2023_kappa	2023-FWD-00037	YES		36	Red	Red	Red	Red
Flexneri_2023_alpha	2023-EIP-00023-1	YES		9	Red	Red	Red	Red
Flexneri_2023_beta	2023-EIP-00023-2	YES		12	Red	Red	Red	Red
Sonnei_2019_alpha	NA	NO	92	Green	Green	Green	Green	
Sonnei_2021_alpha	NA	NO	14	Green	Green	Green	Green	
Sonnei_2023_alpha	NA	YES	8	Green	Yellow	Green	Green	
Sonnei_2023_beta	NA	NO	25	Red	Yellow	Red	Red	
Sonnei_2023_gamma	NA	NO	12	Red	Red	Red	Red	
Sonnei_2023_delta	NA	NO	7	Red	Red	Red	Red	
Sonnei_2023_epsilon	NA	NO	26	Red	Red	Red	Red	
Sonnei_2023_zeta	NA	YES	53	Green	Red	Green	Red	

¹ Clusters were named after the year of first appearance

² NA, no international alert at time of writing

³ Based on M/V ratio >3

⁴ Number of isolates belonging tot this cluster on 31/12/2023.

⁵ Antimicrobial resistance to cephalosporines (CSP), ciprofloxacin (CIP), azithromycin (AZM) and Co-trimoxazole (Cotrim) is indicated in red shading, Susceptible at Increased Exposure (I) is indicated in yellow.

Sinds 2023 worden alle bevestigde *Shigella* spp. prospectief opgevolgd met WGS, waardoor de verschillende klonale groepen in detail kunnen worden opgevolgd. Er werden 14 clusters (gedefinieerd als >4 isolaten met <8 allelen verschil in 6 maanden) gedetecteerd en opgevolgd. Alle (historische en opvolgende) stammen die eveneens clusteren worden meegenomen in verdere analyse (Tabel 3).

Vier **internationale, MSM gerelateerde clusters** zijn gerelateerd aan twee EpiPulse alerts: 2023-EIP-0023 en 2023-FWD-00037.

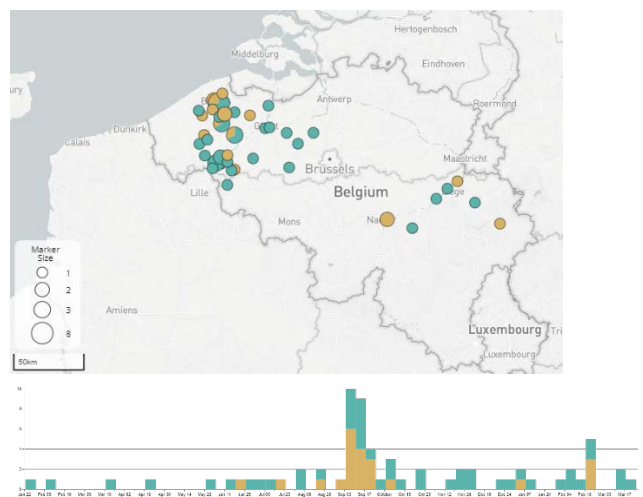
- EpiPulse alert 2023-EIP-0023 beschrijft (i) de cluster Sonnei_2020_alpha met XDR *S. sonnei* (n=35 in 2023) die resistent zijn voor 3^{de} generatie cephalosporines, macroliden en fluoroquinolonen, met een piek in de zomermaanden en geografische spreiding over Antwerpen, Kortrijk, Brussel en Luik, en (ii) twee klonale groepen van XDR *S. flexneri* 2a (2023_alpha en 2023_beta), met 9 en 5 isolaten in 2023.
- Alert 2023-FWD-00037 (Sonnei_2023_kappa) omvat een cluster van XDR *S. sonnei* stammen (n=35 in 2023) die internationaal verspreid zijn, en o.a. gerapporteerd werden in Nederland, Denemarken, Zweden, Ierland en Duitsland. Opvallend is de geografische clustering in Gent, Kortrijk, Namen en Luik.

Opvallende nationale clusters waren de volgende:

- Cluster Sonnei_2023_gamma omvat 12 stammen van *S. sonnei*, waarvan 10/12 geïsoleerd werden uit kinderen jonger dan 10 jaar, allen uit de omgeving uit Antwerpen. Een brononderzoek leverde geen een link

op met de Joodse gemeenschap, en de laatste infectie werd vastgesteld in oktober 2023.

- Cluster Sonnei_2023_zeta is een kloon van *S. sonnei* die actief circuleert in de MSM gemeenschap (Figuur 7). Echter, in September 2023 werd een grote uitbraak waargenomen in West-Vlaanderen, gerelateerd aan een spill-over incident in een restaurant. In totaal werden 23 gerelateerde stammen ontvangen aan het NRC. Uitbraakonderzoek in samenwerking met Department Zorg en FAVV leidde tot het tijdelijk sluiten van de keuken, en opvolging van de medewerkers van het restaurant.



Figuur 7. Overzicht van Cluster Sonnei_2023_zeta met indicenties tussen 02/2023 en 03/2024. Mannelijke en

Vrouwelijke patiënten in groen en geel, resp. De piek in september 2023 is duidelijk zichtbaar.

3.5. REISGERELATEERDE INFECTIES

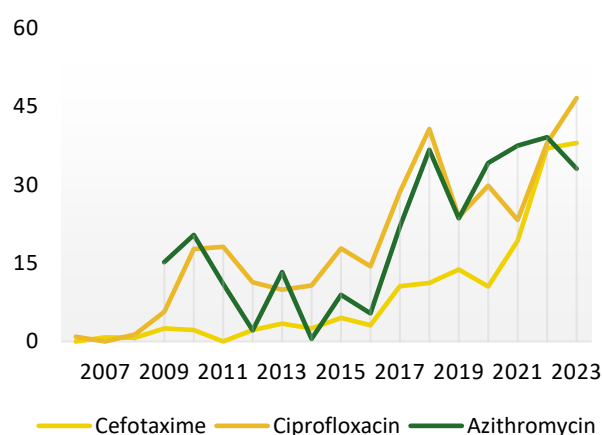
In 2023 werden 73 gevallen (14,1%) gemeld als reisgerelateerd, een gelijkaardig niveau als in 2022 (15,6%) waarbij het pre-coronaniveau (16,8% in 2019) opnieuw werd bereikt. Opvallend waren 19 reisgerelateerde gevallen uit Marokko. Een overzicht van de reisgerelateerde gevallen is weergegeven in Tabel 4.

Tabel 4. *Shigella* stammen gelinkt aan een recent verblijf in het buitenland, 2023.

	Serotype	N
Marocco	<i>S. sonnei</i>	16
	<i>S. flexneri 2a</i>	2
	<i>S. boydii 6</i>	1
Egypt	<i>S. sonnei</i>	6
India	<i>S. flexneri 2a</i>	2
	<i>S. sonnei</i>	4
Senegal	<i>S. flexneri 1b</i>	1
	<i>S. flexneri 2b</i>	1
	<i>S. sonnei</i>	2
Spain	<i>S. sonnei</i>	3
	<i>S. flexneri 1b</i>	1
Brazil	untypable	1
Tunesia	<i>S. sonnei</i>	3
Madagascar	<i>S. boydii 6</i>	1
	<i>S. sonnei</i>	2
Rwanda	<i>S. flexneri 2a</i>	1
	<i>S. sonnei</i>	1
Jordan	<i>S. sonnei</i>	2
Thailand	<i>S. flexneri 2a</i>	1
	<i>S. sonnei</i>	1
Indonesia	<i>S. sonnei</i>	2
Costa Rica	<i>S. flexneri 2a</i>	1
	<i>S. sonnei</i>	1
Saudi Arabia	<i>S. sonnei</i>	2
Guatemala	<i>S. sonnei</i>	1
Georgia	<i>S. flexneri 2a</i>	1
United Kingdom	<i>S. flexneri 3b</i>	1
Guinea	<i>S. flexneri 2a</i>	1
Vietnam	<i>S. sonnei</i>	1
Cape Verde	<i>S. flexneri</i>	1
Greece	<i>S. sonnei</i>	1
Tanzania	<i>S. flexneri 1b</i>	1
Turkey	<i>S. sonnei</i>	1
Togo	<i>S. flexneri</i>	1
Guadeloupe	<i>S. sonnei</i>	1
Congo	<i>S. sonnei</i>	1
Uganda	<i>S. flexneri 2b</i>	1
Nicaragua	<i>S. sonnei</i>	1
Pakistan	<i>S. sonnei</i>	1
Brazil	<i>S. sonnei</i>	1
Mexico	<i>S. flexneri</i>	1

3.6. ANTIBIOTICUMRESISTENTIE

De behandeling van een shigellose bestaat uit een rehydratatie en, indien nodig, een antibioticabehandeling. De antibiotica zorgen meestal voor een snelle genezing zonder nasleep. Oorspronkelijk kon een groot aantal antibiotica efficiënt gebruikt worden voor de behandeling van shigellose. In de praktijk echter, verkleint het spectrum van de bruikbare antibiotica jaar na jaar vanwege een stijging van de antibioticaresistentie. De antibiotica tetracycline, ampicilline en co-trimoxazole die in de jaren '90 als eerste keuze gebruikt werden, zijn momenteel niet meer doeltreffend.



Figuur 7. Evolutie van de resistentie (%) van humane *Shigella* spp. tegen drie klinisch belangrijke antibiotica, 2006-2023. Voor azithromycine worden in deze figuur de epidemiologische cut-off waarden gebruikt.

Momenteel zijn de aanbevolen antibiotica voor de behandeling van shigellose gelijkaardig aan deze voor salmonellosis, namelijk Ciprofloxacin (500 mg), Ceftriaxon (1g IV) of Azitromycine. Recent wordt echter wereldwijd stijgende resistentie tegen ciprofloxacin en azitromycine gerapporteerd, voornamelijk in respectievelijk *S. sonnei* en *S. flexneri* serotype 3a. Hierdoor is een constante opvolging van de antibioticaresistentie noodzakelijk op nationaal niveau. Dit toezicht werd in het verleden occasioneel uitgevoerd, maar sinds 2004 houdt het NRC toezicht op de antimicrobiële gevoeligheid van de geïsoleerde stammen.

Sinds 2017 schakelde het NRC over naar broth microdilutie met dezelfde Sensititre™ platen zoals beschreven voor *Salmonella* (Tabel 1). Via deze methode, werd het antibiogram bepaald voor 487/515 van de bevestigde *Shigella* isolaten. De algemene trends worden voorgesteld in Figuur 7 en Tabel 5.

In dit rapport wordt multidrug resistentie (**MDR**) gedefinieerd als resistentie tegen meer dan 3 klassen van antibiotica. In 2023 bleef dit stabiel op **39,0%**, hoewel de laatste jaren een duidelijke trend naar MDR zichtbaar is. Ter vergelijking, in 2016 bedroeg het aantal MDR *Shigella* stammen nog maar 13,1%. Slechts 2,5% stalen waren gevoelig voor alle geteste antibiotica.

Tabel 5. Globale niet-gevoeligheid (%) van humane *Shigella* spp. in België, zie Tabel 1 voor gebruikte klinische breekpunten.

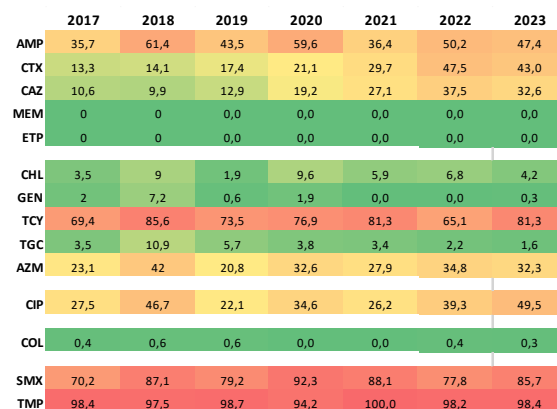
Class	Antibiotic	2020	2022	2023
<i>B-lactams</i>	AMPICILLINE	56,3	59,9	54,4
	CEFOTAXIME	19,2	37,0	38,0
	CEFTAZIDIME	17,8	29,3	29,4
	MEROPENEM	0,0	0,0	0,0
	ERTAPENEM	0,0	0,0	0,0
Protein synthesis inhibitors	CHLORAMPHENICOL	-	-	-
	GENTAMICINE	1,5	1,7	0,6
	TETRACYCLINE	85,3	71,4	71,4
	TIGECYCLINE	-	-	-
	AZITHROMYCINE	-	-	-
Gyrase inhibitors	CIPROFLOXACINE	23,3	38,0	46,6
Cell wall inhibitor	COLISTINE	0,0	0,3	0,2
Folate Synthesis	SULFA-METHOXAZOLE	-	-	-
	TRIMETHOPRIM	89,3	92,3	91,8

De sterke piek in resistentie tegen ciprofloxacine en azithromycine in 2018 (Figuur 7) werd gerelateerd aan sterke toename van hoogresistente *S. sonnei* stammen bij de MSM populatie. De geïnteresseerde lezer verwijzen we graag door naar onze recent gepubliceerde retrospectieve studie (2013-2019) over toenemende resistentie in *S. sonnei*².

Terwijl resistentie bij *S. boydii* zeldzaam is, observeren we verschillende tendensen bij de overige serotypen.

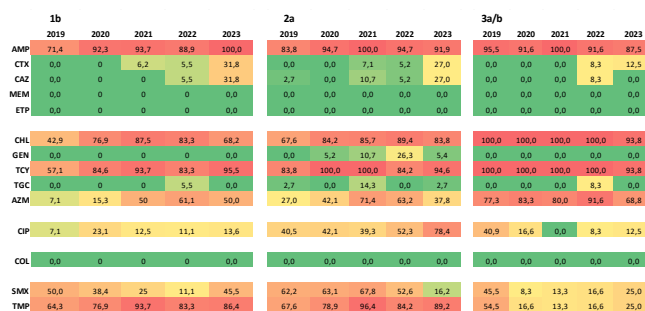
Een zeer opvallende vaststelling bij *S. sonnei* (Figuur 8) is de sterke toename van **resistentie tegen indicator-antibiotica voor ESBL productie (cefotaxime en/of ceftazidime)**, van 15% pre-pandemie tot **43%** in 2023. Deze stijging is voornamelijk te wijten aan hoge circulatie van plasmide-gecodeerde bla_{CTX-M-15} (n=138) en bla_{CTX-M-27} (n=35) genen in specifieke uitbraakstammen (zie sectie 3.4). Deze stammen dragen ook de *qnrB19* en *mphA* genen, respectievelijk leidend tot resistentie tegen ciprofloxacine en macroliden.

De resistentie tegen ciprofloxacine is eveneens hoog in *S. sonnei* (49,5% in 2023), met 134/388 (34,5%) stammen hoogresistent tegen dit antibioticum (MIC_{CIP} ≥ 4 µg/mL). Dit is een stijging tov. vorig jaar. Voor azithromycine (MIC_{AZM} ≥16 mg/L) is het resistentieniveau stabiel op 32%, en veroorzaakt door de genen *mdf(A)*, *mph(A)* en *erm(B)*. Typisch zijn *S. sonnei* isolaten resistent tegen tetracycline en cotrimoxazole (Figuur 8).



Figuur 8. Heatmap voor antibioticumresistentie (%) in *S. sonnei* (2017-2023). Cut-offs voor CHL, AZM, SMX en TGC resistentie werden gezet op 8 µg/ml, 16 µg/ml, 256 µg/ml en 1 µg/ml, respectievelijk. Zie Tabel 1 voor de betekenis van de afkortingen van de verschillende antibiotica.

Het resistentiepatroon van *S. flexneri* (Figuur 9) wordt gekenmerkt door hoge en toenemende resistentie tegen de oude antibiotica ampicilline, chloramfenicol, cotrimoxazole en tetracycline. **Resistentie tegen azithromycine nam de voorbije jaren sterk toe, maar daalde in 2023** in *S. flexneri* 1b (50%) 2a (37,8%), en *S. flexneri* 3a/b (69%). Ciprofloxacine resistentie is enkel een probleem in *S. flexneri* 2a, waar in 2023 een recordhoogte (78,4%) werd gemeten. Opvallend was ook het stijgende niveau in resistentie tegen 3^{de} generatie cephalosporines, zowel in *S. flexneri* 1b (31,8%) als in 2a (27%).



Figuur 9. Heatmaps voor antibioticumresistentie (%) in *S. flexneri* 1b, 2a en 3a/b (2019-2023). Cut-offs voor CHL, AZM, SMX en TGC resistentie werden gezet op 8 µg/ml, 16 µg/ml, 256 µg/ml en 1 µg/ml, respectievelijk. Zie Tabel 1 voor de betekenis van de afkortingen van de verschillende antibiotica.

Over alle *Shigella* spp. heen werd geen of nagenoeg geen ongevoeligheid tegen colistine, gentamicine en de carbapenems geobserveerd.

² Fischer N, Maex M, Mattheus W, Van den Bossche A, Van Cauteren D, Laisnez V, Hammami N, Ceyssens PJ. Genomic epidemiology of persistently circulating MDR *Shigella sonnei* strains associated with men who have sex with men

(MSM) in Belgium (2013-19). J Antimicrob Chemother. 2021 Dec 24;77(1):89-97.

4. Research & Development (ENG)

4.1 PEER-REVIEWED PUBLICATIONS (2023)

The evolution and international spread of extensively drug resistant *Shigella sonnei*.

Mason LCE, Greig DR, Cowley LA, Partridge SR, Martinez E, Blackwell GA, Chong CE, De Silva PM, Bengtsson RJ, Draper JL, Ginn AN, Sandaradura I, Sim EM, Iredell JR, Sintchenko V, Ingle DJ, Howden BP, Lefèvre S, Njamkepo E, Weill FX, Ceyskens PJ, Jenkins C, Baker KS.

Nat Commun. 2023 Apr 8;14(1):1983.

ABSTRACT

Shigella sonnei causes shigellosis, a severe gastrointestinal illness that is sexually transmissible among men who have sex with men (MSM). Multidrug resistance in *S. sonnei* is common including against World Health Organisation recommended treatment options, azithromycin, and ciprofloxacin. Recently, an MSM-associated outbreak of extended-spectrum β -lactamase producing, extensively drug resistant *S. sonnei* was reported in the United Kingdom. Here, we aimed to identify the genetic basis, evolutionary history, and international dissemination of the outbreak strain. Our genomic epidemiological analyses of 3,304 isolates from the United Kingdom, Australia, Belgium, France, and the United States of America revealed an internationally connected outbreak with a most recent common ancestor in 2018 carrying a low-fitness cost resistance plasmid, previously observed in travel associated sublineages of *S. flexneri*. Our results highlight the persistent threat of horizontally transmitted antimicrobial resistance and the value of continuing to work towards early and open international sharing of genomic surveillance data.

[Open access to the paper](#)

Using a combination of short- and long-read sequencing to investigate the diversity in plasmid- and chromosomally encoded extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical *Shigella* and *Salmonella* isolates in Belgium.

Berbers B, Vanneste K, Roosens NHCJ, Marchal K, Ceyskens PJ, De Keersmaecker SCJ.

Microb Genom. 2023 Jan;9(1):mgen000925.

ABSTRACT

For antimicrobial resistance (AMR) surveillance, it is important not only to detect AMR genes, but also to determine their plasmidic or chromosomal location, as this will impact their spread differently. Whole-genome sequencing (WGS) is increasingly used for AMR surveillance. However, determining the genetic context of AMR genes using only short-read sequencing is complicated. The combination with long-read sequencing offers a potential solution, as it allows hybrid assemblies. Nevertheless, its use in surveillance has so far been limited. This study aimed to demonstrate its added value for AMR surveillance based on a case study of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). ESBL genes have been reported to occur also on plasmids. To gain insight into the diversity and genetic context of ESBL genes detected in clinical isolates received by the Belgian National Reference Center between 2013 and 2018, 100 ESBL-producing *Shigella* and 31 ESBL-producing *Salmonella* were sequenced with MiSeq and a representative selection of 20 *Shigella* and six *Salmonella* isolates additionally with

MinION technology, allowing hybrid assembly. The bla CTX-M-15 gene was found to be responsible for a rapid rise in the ESBL Shigella phenotype from 2017. This gene was mostly detected on multi-resistance-carrying IncFII plasmids. Based on clustering, these plasmids were determined to be distinct from the circulating plasmids before 2017. They were spread to different Shigella species and within Shigella sonnei between multiple genotypes. Another similar IncFII plasmid was detected after 2017 containing bla CTX-M-27 for which only clonal expansion occurred. Matches of up to 99 % to plasmids of various bacterial hosts from all over the world were found, but global alignments indicated that direct or recent ESBL-plasmid transfers did not occur. It is most likely that travellers introduced these in Belgium and subsequently spread them domestically. However, a clear link to a specific country could not be made. Moreover, integration of bla CTX-M in the chromosome of two Shigella isolates was determined for the first time, and shown to be related to ISEcp1. In contrast, in Salmonella, ESBL genes were only found on plasmids, of which bla CTX-M-55 and IncHI2 were the most prevalent, respectively. No matching ESBL plasmids or cassettes were detected between clinical Shigella and Salmonella isolates. The hybrid assembly data allowed us to check the accuracy of plasmid prediction tools. MOB-suite showed the highest accuracy. However, these tools cannot replace the accuracy of long-read and hybrid assemblies. This study illustrates the added value of hybrid assemblies for AMR surveillance and shows that a strategy where even just representative isolates of a collection used for hybrid assemblies could improve international AMR surveillance as it allows plasmid tracking.

[Open access to the paper](#)

CONTACT

Wesley Mattheus • Wesley.Mattheus@sciensano.be • T +32 (0)2 373 32 24

VRAGEN, OPMERKINGEN OF
MEER INFORMATIE :

WWW.SCIENSANO.BE

Sciensano • Juliette Wytsmanstraat 14 • 1050 Brussel • België • T + 32 2 642 51 11 • T pers + 32 2 642 54 20 • info@sciensano.be
• www.sciensano.be

Verantwoordelijke uitgever(s): Myriam Sneyers, Algemeen directeur • Juliette Wytsmanstraat 14 • 1050 Brussel • België •