

NATIONAAL REFERENTIE CENTRUM SHIGELLA

Jaarverslag 2024

—

Sciensano
Infectieziekten mens - Bacteriële ziekten
NRC Shigella

Juli 2025 • 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 2024. 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 2024 typeerde het NRC *Shigella* **510 unieke *Shigella* stammen**, een aantal dat stabiel is in vergelijking met 2023 ($n=515$) toen een recordaantal submissions bereikt werd. In vergelijking met het vijfjarig gemiddelde (incl. pandemie) was er een uitgesproken verhoging van het aantal shigellosen in de eerste jaarhelft van 2024. Het aantal gehospitaliseerde patiënten is stabiel op 17%.
- Het onderscheid tussen *Shigella* and *E. coli* infecties blijft moeilijk voor de klinische laboratoria, ondanks de introductie van moleculaire panels. In 2024 waren 17,1% van alle toegezonden stalen geen *Shigella* spp., maar commensale *E. coli*.
- Net zoals in de voorbije jaren, vond men in 2024 de hoogste incidentie van shigellosen terug bij mannen tussen 25 en 44 jaar. In 2024 was er een lichte stijging van de proportie stalen afkomstig van mannelijke patiënten (**M/V ratio van 1,71** tov. 1,43 in 2023).
- Terwijl in 2020 het aantal *S. sonnei* isolaten daalde naar 52, vertegenwoordigde dit species dit jaar **66%** (336/510) van het totale aantal shigellosen in België. 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 bleven deze aantallen stabiel, maar in 2024 nam de proportie *S. flexneri* infecties wel opvallend toe, van 20% in 2023 naar **31.2%** (159/510). De meest prevelante serotypen blijven *S. flexneri* 2a (11,2% in 2024 ten opzichte van 7,8% in 2023) en *S. flexneri* 1b (8,8% in 2024 tov. 4,7% in 2023).
- Sinds 2023 worden **alle bevestigde *Shigella* spp. prospectief geanalyseerd met WGS**, waardoor de verschillende klonale groepen in detail kunnen worden opgevolgd. Er werden 15 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 internationale clusters van XDR *S. sonnei* en *S. flexneri* 2a gerelateerd aan homoseksuele mannen.
- In 2024 werden 65 gevallen (13%) gemeld als reisgerelateerd, een verdrievoudiging in vergelijking met 2021 waarbij het pre-coronaniveau (16.8% in 2019) opnieuw werd bereikt. Van deze reisgebonden stalen waren 16 gevallen afkomstig uit Marokko.
- In 2024 waren 45% 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 **44%** in 2024. Deze stijging is voornamelijk te wijten aan hoge circulatie van plasmide-gecodeerde bla_{CTX-M-15} en bla_{CTX-M-27} genen in specifieke uitbraakstammen. Deze stammen dragen vaak ook de *qnrB19* en *mphA* genen, respectievelijk leidend tot resistentie tegen ciprofloxacin en macroliden. De resistentie tegen ciprofloxacin is eveneens hoog (43,6% in 2024), met 132/335 (39,4%) stammen hoogresistent tegen dit antibioticum (MIC_{CIP} ≥ 4 µg/mL).
- 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 2024** in *S. flexneri* 3a/b (47%). Ciprofloxacin resistentie is enkel een probleem in *S. flexneri* 2a, waar in 2024 opnieuw een recordhoogte (89%) werd gemeten. Opvallend was ook het stijgende niveau in resistentie tegen 3^{de} generatie cephalosporines (CTX en CAZ), zowel in *S. flexneri* 1b als in 2a, en dit voornamelijk gelinkt het bla_{CTX-M-27} gen in circulerende XDR *S. flexneri* stammen in MSM.
- Er was geen of nagenoeg geen ongevoeligheid tegen gentamicine, colistine en de carbapenems.
- Het NRC publiceerde in 2024 **één peer-reviewed artikel** over de toekomstige implementie van Oxford Nanopore sequencing.

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	9
3.4. Geografische spreiding en uitbraken	10
3.5. Reisgerelateerde infecties	11
3.6. Antibioticumresistentie	12
● 4. RESEARCH & DEVELOPMENT (ENG)	15
4.1 Peer-reviewed publications (2024)	15

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://epistat.sciensano.be/pro/analytics.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 schept 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 S24BD0000x, 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

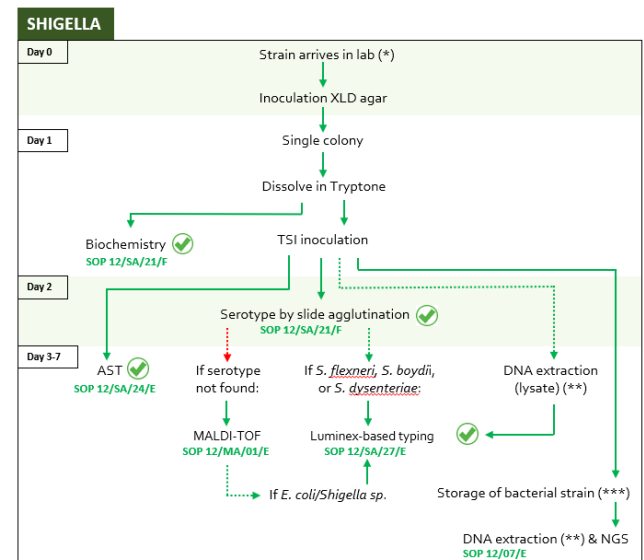
Het genus *Shigella* behoort tot de familie van de *Enterobacteriaceae* en bevat vier species: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* en *S. sonnei*. De identificatie van deze 4 species is gebaseerd op biochemische eigenschappen en antigeen-kenmerken.

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

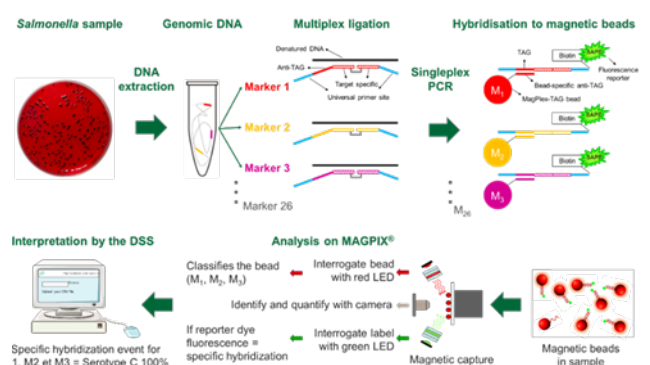
De workflow van het NRC Shigella wordt schematisch weergegeven in Figuur 1. Na opzuivering van de stam op XLD agar, wordt het serotype van de stam geïdentificeerd met Triple Sugar Iron Agar (TSI, Biotrading, NL) agglutinaties van de somatische O-antigenen, gebruik makend van

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



Figuur 1. Workflow in het NRC Shigella, 2024. 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 markeringen 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.14.0 (Tabel 1). In het geval van meningitis beveelt EUCAST klinische breekpunten aan van 0,125 µg/mL, 1 µg/mL en 2 µg/mL voor respectievelijk ciprofloxacin, cefotaxime en meropenem.

Tabel 1. Antibiotica getest via broth microdilutie.

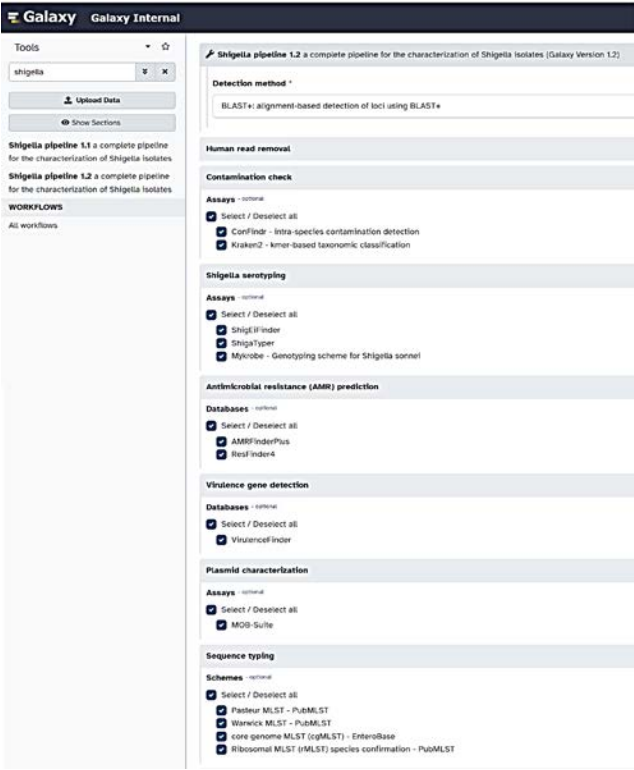
Antibioticum	CODE	Geteste conc. (mg/L)	Gevoeligheids-breekpunt (mg/L) ^{1,3}
AMPICILLINE IV	AMP	1-64	8.0
AZYTHROMYCINE ²	AZI	2-64	ND
CEFOTAXIME	FOT	0.25-4	1.0
CEFTAZIDIME	TAZ	0.5-8	1.0
CHLORAMPHENICOL	CHL	8-64	ND
CIPROFLOXACINE	CIP	0.015-8	0.25
COLISTINE	COL	0.5-8	(2.0)
ERTAPENEM	ETP	0.015-2	0.5
GENTAMICINE	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 KitTM 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, en beschikbaar in https://galaxy-tag.sciensano.be/?tool_id=pipeline_shigella_1.2&version=latest (Figuur 3). Phylogenetische clustering wordt uitgevoerd in BioNumerics 8.1, en geografische spreiding gevisualiseerd met MicroReact.

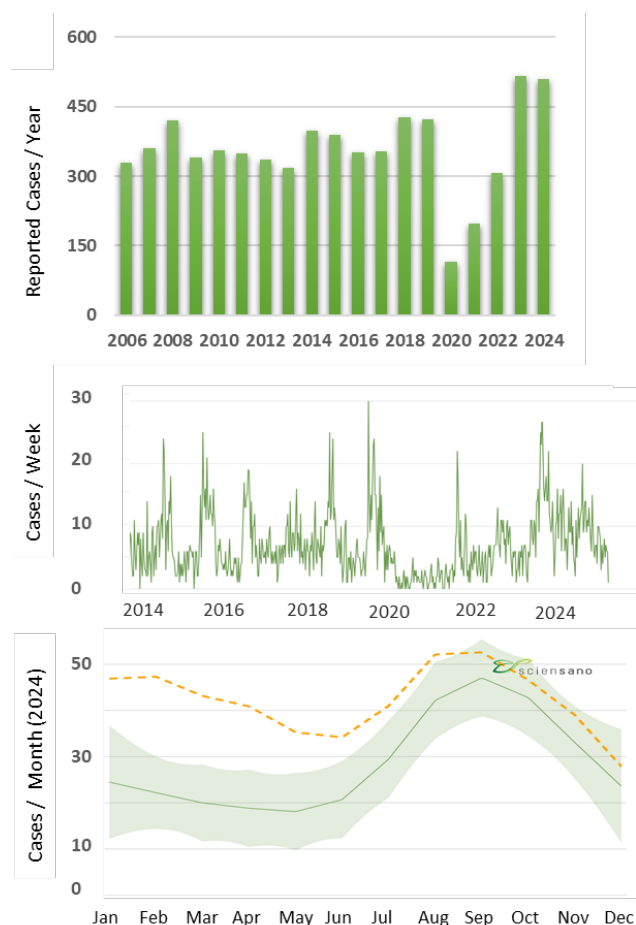


Figuur 3. Bioinformatische pipeline voor de analyse van human Shigella spp.

3. RESULTATEN

3.1 STAALCOLLECTIE: AANTAL EN SPECIMEN

Het voorbije jaar typeerde het NRC *Shigella* isolaten in opdracht van 59 klinische laboratoria, wat een daling is van 35% tov 2023. Uit deze stalen identificeerde het NRC **510 unieke *Shigella* stammen**, een aantal dat wel stabiel is in vergelijking met 2023 ($n=515$) toen 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 eerste jaarhelft van 2024 (Figuur 3, midden en onder).

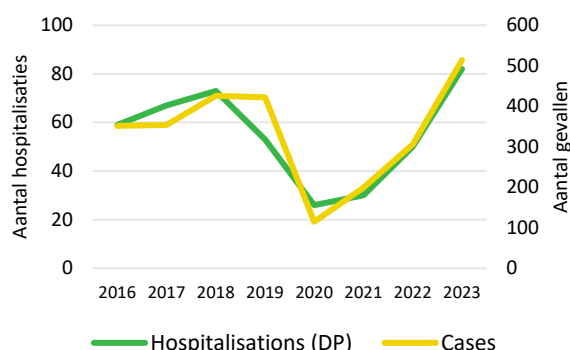


Figuur 4. Boven: Totaal aantal bevestigde *Shigella* spp. onderzocht aan het NRC, weergegeven per jaar voor de periode 2006-2024. Midden: Overzicht van de wekelijks gerapporteerde Shigellosen in de periode 2014-2024. Onder: Overzicht van de maandelijks gerapporteerde Shigellosen in 2023 (oranje), in vergelijking met het vijfjarig gemiddelde (groen).

² De primaire diagnose is de aandoening die primair verantwoordelijk is voor de opname van de patiënt in het ziekenhuis voor behandeling

De Minimale Ziekenhuis Gegevens (MZG) is een geanonimiseerd systeem voor het registreren van administratieve, medische en verpleegkundige gegevens met betrekking tot alle ziekenhuisopnames, waaraan alle niet-psychiatrische ziekenhuizen in België moeten bijdragen. Ziekten worden gecodeerd volgens de International Classification of Diseases, 10e versie (ICD-10).

De gepresenteerde gegevens (Figuur 5) tonen het jaarlijkse aantal mensen dat in het ziekenhuis werd opgenomen met als primaire diagnose² Shigellose (ICD-10 code A03) tussen 2016 en 2023, dat stabiel rond de 17% ligt in deze periode.



Figuur 5. Overzicht van het aantal ziekenhuisopnames vs. Het aantal Shigellosen, 2016-2023.

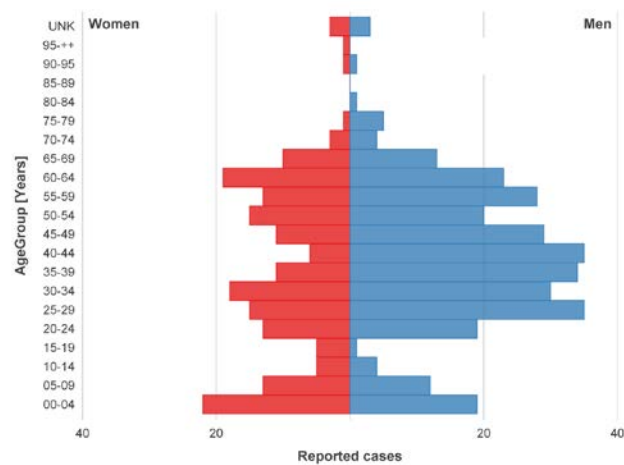
Van de 630 stammen die in totaal werden ontvangen ter typering, toonden biochemische en moleculaire testen (Kligler-Hajna, urease, MALDI-TOF) en/of afwezigheid van agglutinatie bij serotypering aan dat **17,1% (108/630) geen *Shigella* spp.** betrof, hetgeen opnieuw een hogere proportie vals positieven is in vergelijking met vorig jaar. Met de 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 1,7% (12/630) geen groei meer. De grote meerderheid van de bevestigde *Shigella* stammen (505/510, **98%**) werden geïsoleerd uit **faeces**, hoewel er ook vijf stammen geïsoleerd werd uit bloed (1%). Voor vier stammen werd 'ander' geselecteerd als specimen, en voor één stam was het specimen onbekend.

3.2 LEEFTIJD- EN GENDERDISTRIBUTIE

Net zoals in de voorbije jaren, vond men in 2024 de hoogste incidentie van shigellosen terug bij mannen tussen 25 en 44 jaar (Figuur 5), met een **M/V ratio van 1,71** tov. 1,43 in 2023

en 1,64 in 2022). Zoals blijkt uit Figuur 6, wordt deze M/V discrepantie inderdaad volledig bepaald door de overrepresentatie van stammen uit volwassen mannen tussen 20 en 59 jaar.

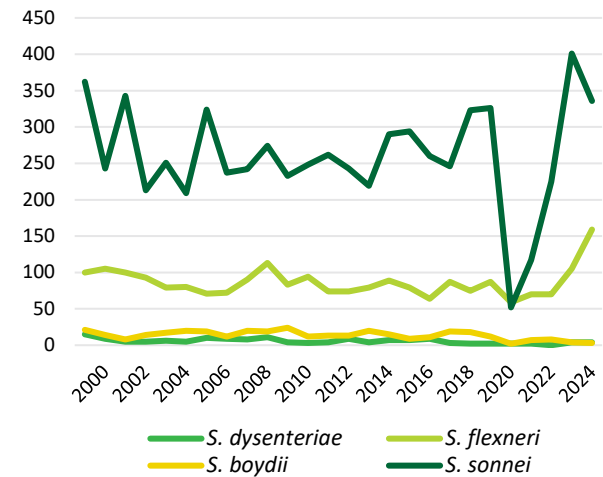


Figuur 6. Leeftijdspiramide gegenereerd voor de bevestigde *Shigella* infecties, periode 2024.

3.3. SPECIES EN SEROVAR DISTRIBUTIE

De proportie van de verschillende *Shigella* spp. wordt samengevat in Tabel 2 en Figuur 7. Zoals geïllustreerd wordt in deze Figuur 7, 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, maar ook in 2024 vertegenwoordigden ze 336/510 (**65.9%**) van het totale aantal shigellosen in België.

Het aantal *S. boydii* stammen, typisch geassocieerd met reizen naar Indië, was laag (0,8%, 4/510), net zoals het aantal *S. dysenteriae* isolaten (0,6%, 3/510).



Figuur 7. Evolutie van het absolute aantal unieke *Shigella* stammen geanalyseerd aan het NRC, volgens species, periode 1999-2024.

Een opvallende vaststelling tijdens de pandemie was dat de prevalentie van *S. flexneri* veel minder afhankelijk was van de Covid maatregelen (Figuur 5, Tabel 2), waarbij de absolute aantallen min of meer op pre-pandemie niveau bleven. In 2024 nam de proportie *S. flexneri* infecties wel opvallend toe (zie Sectie 3.4), van 20% in 2023 naar **31.2%** (159/510) in 2024. De meest prevalentie serotypen blijven *S. flexneri* 2a (11,2% in 2024 ten opzichte van 7,8% in 2023) en *S. flexneri* 1b (8,8% in 2024 tov. 4,7% in 2023).

Tabel 2. Overzicht van de verschillende geïdentificeerde serotypen aan het NRC, 2024.

Serotype		N	%
<i>Sonnei</i>		336	65,9
<i>Flexneri</i>	2a	57	11,2
	1b	45	8,8
	3b	9	1,8
	6	7	1,4
	3a	10	2,0
	4	3	0,6
	Y	5	1,0
	5	2	0,4
	2b	2	0,4
	x	1	0,2
UNK		17	3,3
<i>Boydii</i>	2	2	0,4
	8	1	0,2
	12	1	0,2
<i>Dysenteriae</i>	7	2	0,4
	2	1	0,2

Tabel 3. Overzicht van Shigella clusters in 2024.

	Cluster ¹	EPIS ²	MSM ³	Travel	Isolates (total)	Isolates in 2024 ⁴	AMR ⁵			
							CSP	CIP	AZM	Cotrim
INTERNATIONAL ALERTS	Sonnei_2020_alpha	ARH-00002 / 2023-EIP-00023	YES	Capo Verde Tunisia	94	2				
	sonnei_2022_alpha	2022-FWD-00088	NO		20	9				
	Sonnei_2022_beta	2022-FWD-00092	NO		21	3				
	Sonnei_2023_kappa	2023-FWD-00037	YES		127	93				
	Flexneri_2023_alpha	2023-EIP-00023-1	YES		27	18				
	Flexneri_2023_beta	2023-EIP-00023-2	YES		24	12				
	Sonnei_2023_zeta	2024-FWD-00074	YES	Egypt/Jordan	83	30				
	Sonnei_2023_beta	2024-FWD-00091	NO		54	29				
	Sonnei_2023_gamma	2024-FWD-00092	NO		26	14				
	Flexneri_2024_alpha	2024-FWD-00094	YES		22	8				
NATIONAL OUTBREAKS	Flexneri_2024_beta	2024-FWD-00093	YES		19	15				
	Sonnei_2019_alpha	NA	NO	Morocco	109	18				
	Sonnei_2021_alpha	NA	NO	Morocco	27	13				
	Sonnei_2023_alpha	NA	YES		9	1				
	Sonnei_2023_delta	NA	NO	Egypt	16	9				
	Sonnei_2023_epsilon	NA	NO		30	4				
	Sonnei_2024_alpha	NA	NO	Congo	5	5				
	Flexneri_2024_gamma	NA	YES		8	8				
	Sonnei_2024_beta	NA	NO	Morocco	9	6				

¹ Clusters were named after the year of first appearance

² NA, no international alert at time of writing

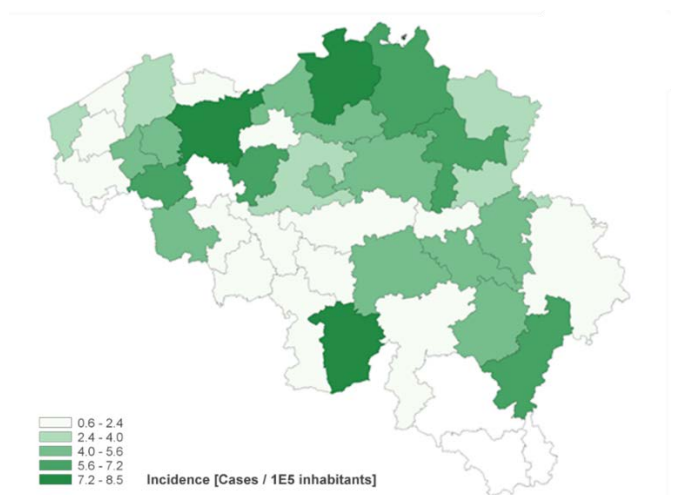
³ Based on M/V ratio >3

⁴ Number of isolates belonging tot this cluster isolated between 01/12/2024 and 31/12/2024.

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.

3.4. GEOGRAFISCHE SPREIDING EN UITBRAKEN

Een overzicht van de geografische spreiding van de humane Shigellosen is weergegeven in Figuur 8. In 2024 was de meerderheid van de stammen (64,7%) afkomstig uit Vlaanderen; Waalse en Brusselse patiënten zorgden voor 19,6% en 11,2% van de stammen, respectievelijk. Deze verdeling over de regio's is zeer gelijkaardig in vergelijking met de voorbije jaren. Bekeken per arrondissement (met n>5 gevallen) werden in 2024 de hoogste incidenties gemeten in **Antwerpen** 8,4 gevallen/100,000 bewoners), **Gent** (7,3 gevallen /100,000 bewoners) en **Kortrijk** (7 gevallen/100,000 bewoners).



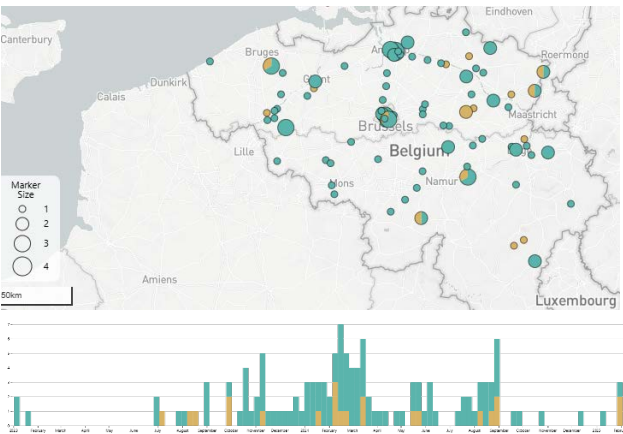
Figuur 8. Incidentie van het totaal aantal humane *Shigella* infecties per arrondissement (2024), op basis van het aantal gevallen bevestigd door het NRCS. Weergegeven per 100,000 inwoners.

Sinds 2023 worden alle bevestigde *Shigella* spp. prospectief opgevolgd met WGS, waardoor de verschillende klonale groepen in detail kunnen worden opgevolgd. Er werden 15 clusters (gedefinieerd als >4 isolaten met <8 allelen verschil in 6 maanden) gedetecteerd en opgevolgd in 2024. Alle (historische en opvolgende) stammen die eveneens

clusteren worden meegenomen in verdere analyses (Tabel 3).

Deze tabel 3 toont dat meer dan 45% (233/510) van de Belgische Shigellosis zijn gelinkt aan **internationale clusters** en bijhorende EpiPulse alerts. De voornaamste nationale en internationale clusters worden hier kort besproken.

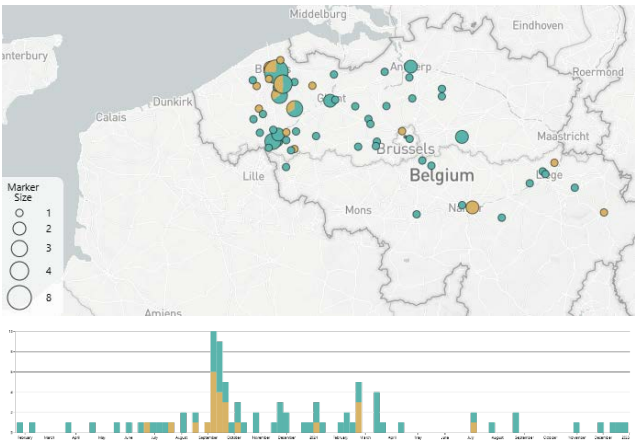
- Cluster Sonnei_2023_gamma omvat in totaal 26 stammen van *S. sonnei*, waarvan 21 geïsoleerd werden uit kinderen jonger dan 10 jaar, allen uit de omgeving uit Antwerpen. Het NRC lanceerde een internationaal alert ([2024-FWD-00092](#)) voor deze casus, en identieke stammen werden teruggevonden in Nederland (2) en USA (3), gelinkt met reizen naar Israël en/of in religieuze scholen.
- Alert [2023-FWD-00037](#) (Sonnei_2023_kappa, Figuur 9) omvat een cluster van XDR *S. sonnei* stammen (n=93 in 2024) die internationaal verspreid zijn in de MSM gemeenschap, en o.a. gerapporteerd werden in Nederland, Denemarken, Zweden, Ierland en Duitsland. Deze piek van infecties vond plaats in de zomer van 2024, in het najaar en winter waren er elk sporadische infecties.



Figuur 9. Geografische clustering en tijdlijn van infecties in Cluster Sonnei_2023_Kappa met indicenties tussen 07/2023 en 02/2025. Groen, man; Oranje, vrouw.

- Het NRC lanceerde ook alert [2024-FWD-00091](#), ivm cluster Sonnei_2023_beta (bla_{CTX-M-15}, qnrS1) die sinds 2018 circuleert bij reizigers uit Egypte en Jordanië. In 2024 werden 29 gevallen gerapporteerd. Deze stam werd ook gesignaleerd in Nederland (n=11), Duitsland (n=3), Denemarken (n=1), en de Verenigde Staten (n=12).
- Cluster Sonnei_2023_zeta ([2024-FWD-00074](#)) is een kloon van *S. sonnei* die actief circuleert in de MSM gemeenschap (Figuur 10), en in September 2023 een groot spill-over veroorzaakte in West-Vlaanderen. In 2024 werd een internationaal alert aangemaakt door Noorwegen, hetgeen de brede verspreiding van deze stam aantoonde in Nederland (n=56), Ierland (n=18),

Belgie (n=83), Duitsland (n=8) en de Verenigde Staten (n=268).



Figuur 10. Overzicht van Cluster Sonnei_2023_zeta met indicenties tussen 02/2023 en 02/2025. Mannelijke en Vrouwelijke patiënten in groen en geel, resp. De piek in september 2023 is duidelijk zichtbaar.

- Er zijn tenminste drie nationale clusters van *S. sonnei* gerelateerd aan recente reizen naar Marokko (Sonnei_2019_alpha, 2021_alpha en 2024_beta). Deze stammen zijn veelal gevoelig aan antibiotica, en komen voornamelijk voor bij vrouwen en kinderen.

3.5. REISGERELATEERDE INFECTIES

In 2024 werden 65 gevallen (12,7%) gemeld als reisgerelateerd, een gelijkaardig niveau als in de voorbije jaren (14-16%). Opvallend waren 16 reisgerelateerde gevallen uit Marokko, en zes uit Spanje en Egypte. Een overzicht van de reisgerelateerde gevallen is weergegeven in Tabel 4.

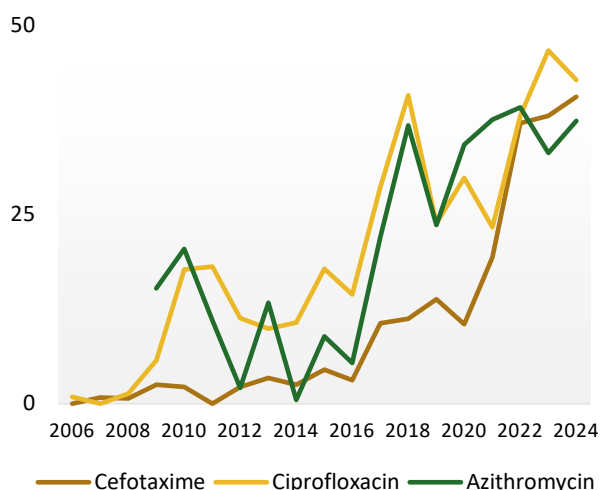
Tabel 4. *Shigella* stammen gelinkt aan een recent verblijf in het buitenland, 2024.

Serotype		N
Marocco	<i>S. sonnei</i>	9
	<i>S. flexneri</i> 2a	2
	<i>S. dysenteriae</i> 7	1
	<i>S. flexneri</i> 1b	1
	<i>S. flexneri</i> 2a	1
	<i>S. flexneri</i> 4	1
	<i>S. boydii</i> 6	1
Spain	<i>S. flexneri</i> 2a	2
	<i>S. sonnei</i>	4
Egypt	<i>S. sonnei</i>	6
India	<i>S. flexneri</i> 2a	1
	<i>S. sonnei</i>	2
Congo	<i>S. flexneri</i> 1b	1
	<i>S. flexneri</i> 3a	1
	<i>S. sonnei</i>	1
Mexico	<i>S. flexneri</i> 2a	1
	<i>S. flexneri</i> 3a	1

	<i>S. sonnei</i>	1
Cameroon	<i>S. dysenteriae</i> 2	1
	<i>S. sonnei</i>	1
Kenya	<i>S. sonnei</i>	2
Burundi	<i>S. sonnei</i>	2
South Africa	<i>S. flexneri</i> 4	1
	<i>S. sonnei</i>	1
Costa	<i>S. sonnei</i>	2
Senegal	<i>S. flexneri</i> 4a	1
	<i>S. flexneri</i> 6	1
Nigeria	<i>S. flexneri</i> 1b	1
Cuba	<i>S. flexneri</i> 2a	1
Rwanda	<i>S. sonnei</i>	1
Indonesia	<i>S. flexneri</i> 2a	1
Cape Verde	<i>S. sonnei</i>	1
Madagascar	<i>S. sonnei</i>	1
CAR	<i>S. sonnei</i>	1
Colombia	<i>S. sonnei</i>	1
Czech Republic	<i>S. flexneri</i> y	1
Combodja	<i>S. sonnei</i>	1
Afghanistan	<i>S. flexneri</i> 2a	1
Benin	<i>S. flexneri</i> 1b	1
Gambia	<i>S. sonnei</i>	1
Ghana	<i>S. flexneri</i> 1b	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 11. Evolutie van de resistentie (%) van humane *Shigella* spp. tegen drie klinisch belangrijke antibiotica, 2006-2024. 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. In de aanvragen tot typering ontvangen door het NRC, werd in 116/510 submissies aangegeven dat er antibiotica werd voorgeschreven. In **43%** (48/116) van de gevallen was dit **azithromycine**, in **7%** van de gevallen **ciprofloxacin**. Echter wordt er recent een wereldwijde 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.

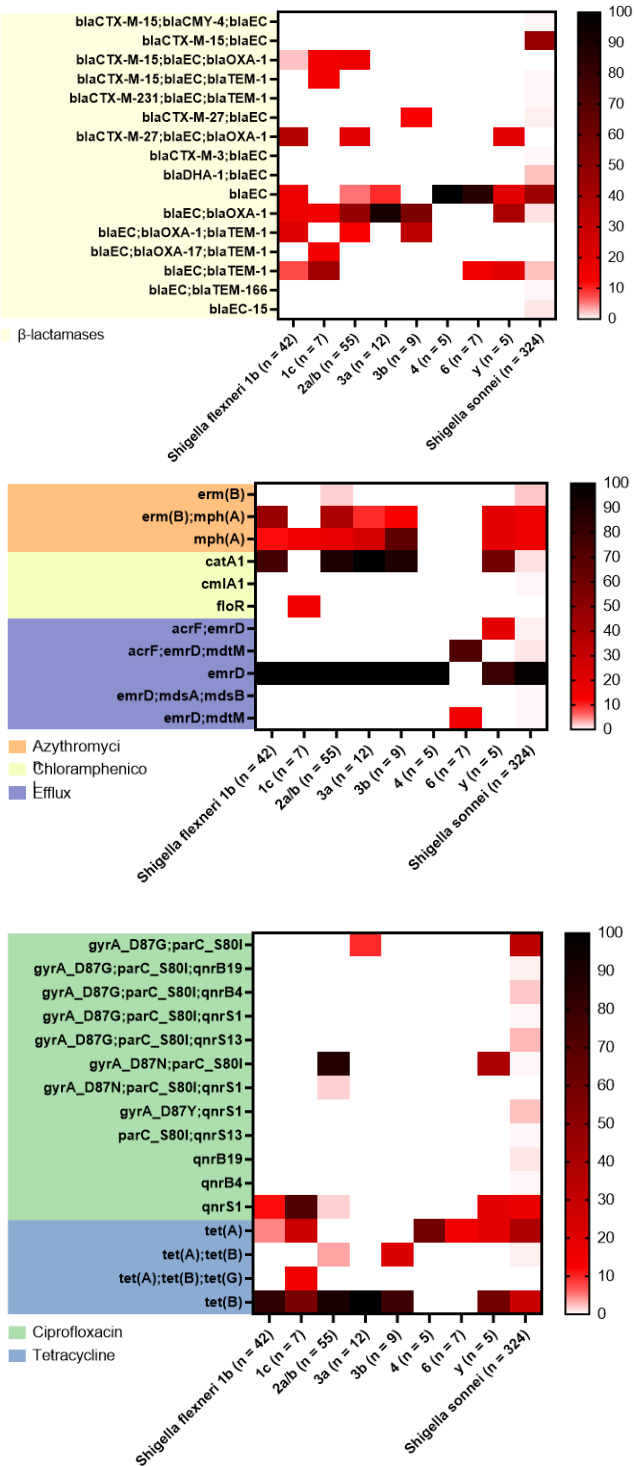
Sinds 2017 schakelde het NRC over naar broth microdilutie met dezelfde Sensititre™ platen zoals beschreven voor *Salmonella* (Tabel 1). Via deze methode, werd het antibiogram bepaald voor 504/510 van de bevestigde *Shigella* isolaten. De algemene trends worden voorgesteld in Figuur 11 en Tabel 5.

In dit rapport wordt multidrug resistentie (**MDR**) gedefinieerd als resistentie tegen meer dan 3 klassen van antibiotica. In 2024 steeg het aantal MDR stammen van **39,0%** naar **44,6%** in 2024. Ter vergelijking, in 2016 bedroeg het aantal MDR *Shigella* stammen nog maar 13,1%. Slechts 6,5% 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	2022	2023	2024
<i>B-lactams</i>	AMPICILLINE	59,9	54,4	61,7
	CEFOTAXIME	37,0	38,0	40,5
	CEFTAZIDIME	29,3	29,4	34,3
	MEROPENEM	0,0	0,0	0,0
	ERTAPENEM	0,0	0,0	0,0
<i>Protein synthesis inhibitors</i>	CHLORAMPHENICOL	-	-	-
	GENTAMICINE	1,7	0,6	1,2
	TETRACYCLINE	71,4	71,4	74,2
	TIGECYCLINE	-	-	-
	AZYTHROMYCINE	34,8	32,3	33,4
<i>Gyrase inhibitors</i>	CIPROFLOXACINE	38,0	46,6	42,7
<i>Cell wall inhibitor</i>	COLISTINE	0,3	0,2	0,2
<i>Folate Synthesis</i>	SULFA-METHOXAZOLE	-	-	-
	TRIMETHOPRIM	92,3	91,8	88,1

De sterke piek in resistentie tegen ciprofloxacine en azithromycine in 2018 (Figuur 11) werd gerelateerd aan sterke toename van hoogresistente *S. sonnei* stammen bij de MSM populatie. De geïnteresseerde lezer verwijzen we graag door naar onze gepubliceerde retrospectieve studie (2013-2019) over toenemende resistentie in *S. sonnei*³.



Figuur 12. Heatmaps voor de verschillende resistentiegenen (%) voor de verschillende antibioticaklassen, geïdentificeerd in *S. sonnei* en in *S. flexneri* (n>5), geïdentificeerd in NGS data.

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

Een zeer opvallende vaststelling bij *S. sonnei* (Figuur 13) is de sterke toename van **resistentie tegen indicator-antibiotica voor ESBL productie (cefotaxime en/of ceftazidime)**, van 15% pre-pandemie tot **44%** in 2024. Deze stijging is voornamelijk te wijten aan hoge circulatie van plasmide-gecodeerde blaCTX-M-15 genen in specifieke uitbraakstammen (Figuur 12). Deze stammen dragen vaak ook de *qnrB19* en *mphA* genen, respectievelijk leidend tot resistentie tegen ciprofloxacine en macroliden.

De resistentie tegen ciprofloxacine is eveneens hoog in *S. sonnei* (43,6% in 2024), met 132/335 (39,4%) stammen hoogresistent tegen dit antibioticum (MIC_{CIP} ≥ 4 µg/mL). Deze resistentie is voornamelijk gelinkt aan mutaties in het *gyrA* gen. Voor azithromycine (MIC_{AZM} ≥16 mg/L) blijft het resistentieniveau stabiel op 33%, en wordt veroorzaakt door de genen *mdf(A)*, *mph(A)* en *erm(B)*. Als laatste, zijn *S. sonnei* isolaten ook typisch resistent tegen tetracycline en cotrimoxazole (Figuur 13).

	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
AMP	35,7	61,4	43,5	59,6	36,4	50,2	47,4	53,7
CTX	13,3	14,1	17,4	21,1	29,7	47,5	43,0	47,8
CAZ	10,6	9,9	12,9	19,2	27,1	37,5	32,6	39,1
MEM	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ETP	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CHL	3,5	9	1,9	9,6	5,9	6,8	4,2	5,9
GEN	2	7,2	0,6	1,9	0,0	0,0	0,3	0,6
TCY	69,4	85,6	73,5	76,9	81,3	65,1	81,3	71,3
TGC	3,5	10,9	5,7	3,8	3,4	2,2	1,6	8,7
AZM	23,1	42	20,8	32,6	27,9	34,8	32,3	33,4
CIP	27,5	46,7	22,1	34,6	26,2	39,3	49,5	43,6
COL	0,4	0,6	0,6	0,0	0,0	0,4	0,3	0,0
SMX	70,2	87,1	79,2	92,3	88,1	77,8	85,7	73,4
TMP	98,4	97,5	98,7	94,2	100,0	98,2	98,4	97,1

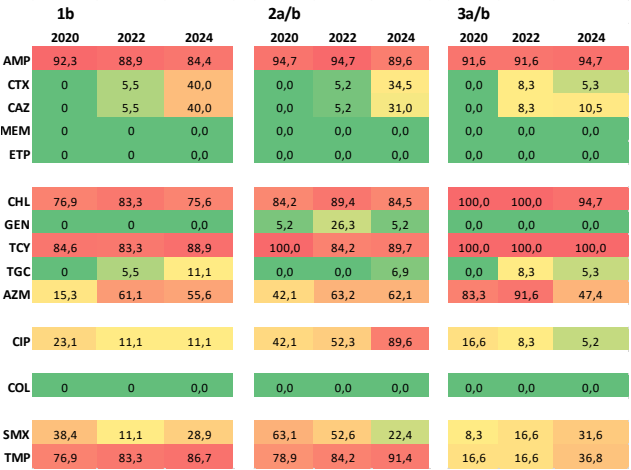
Figuur 13. Heatmap voor antibioticumresistentie (%) in *S. sonnei* (2017-2024). Cut-offs voor CHL, AZM, SMX en TGC resistentie werden gezet op 8 µg/ml, 16 µg/ml, 256 µg/ml en 1 µg/ml, respectievelijk. Zie Tabel 1 voor de betekenis van de afkortingen van de verschillende antibiotica.

Het resistentiepatroon van *S. flexneri* (Figuur 14) 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 2024 in *S. flexneri* 3a/b (47%).** Ciprofloxacine resistentie is enkel een probleem in *S. flexneri* 2a, waar in 2024 opnieuw een recordhoogte (89%) werd gemeten. Opvallend was ook het stijgende niveau in resistentie tegen 3^{de} generatie cephalosporines (CTX en CAZ), zowel in *S. flexneri* 1b als

³ 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.

in 2a, en dit voornamelijk gelinkt het bla_{CTX-M-27} gen in circulerende XDR *S. flexneri* stammen in MSM (Sectie 3.4).



Figuur 14. Heatmaps voor antibioticumresistentie (%) in *S. flexneri* 1b, 2a en 3a/b (2020-2024). 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.

4. Research & Development (ENG)

■

4.1 PEER-REVIEWED PUBLICATIONS (2024)

Closing the gap: Oxford Nanopore Technologies R10 sequencing allows comparable results to Illumina sequencing for SNP-based outbreak investigation of bacterial pathogens.

Bogaerts B, Van den Bossche A, Verhaegen B, Delbrassinne L, Mattheus W, Nouws S, Godfroid M, Hoffman S, Roosens NHC, De Keersmaecker SCJ, Vanneste K. J Clin Microbiol. 2024 May 8;62(5):e0157623.

doi: 10.1128/jcm.01576-23. Epub 2024 Mar 5. PMID: 38441926; PMCID: PMC11077942.

Abstract

Whole-genome sequencing has become the method of choice for bacterial outbreak investigation, with most clinical and public health laboratories currently routinely using short-read Illumina sequencing. Recently, long-read Oxford Nanopore Technologies (ONT) sequencing has gained prominence and may offer advantages over short-read sequencing, particularly with the recent introduction of the R10 chemistry, which promises much lower error rates than the R9 chemistry. However, limited information is available on its performance for bacterial single-nucleotide polymorphism (SNP)-based outbreak investigation. We present an open-source workflow, Prokaryotic Awesome variant Calling Utility (PACU) (<https://github.com/BioinformaticsPlatformWIV-ISP/PACU>), for constructing SNP phylogenies using Illumina and/or ONT R9/R10 sequencing data. The workflow was evaluated using outbreak data sets of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by comparing ONT R9 and R10 with Illumina data. The performance of each sequencing technology was evaluated not only separately but also by integrating samples sequenced by different technologies/chemistries into the same phylogenomic analysis. Additionally, the minimum sequencing time required to obtain accurate phylogenetic results using nanopore sequencing was evaluated. PACU allowed accurate identification of outbreak clusters for both species using all technologies/chemistries, but ONT R9 results deviated slightly more from the Illumina results. ONT R10 results showed trends very similar to Illumina, and we found that integrating data sets sequenced by either Illumina or ONT R10 for different isolates into the same analysis produced stable and highly accurate phylogenomic results. The resulting phylogenies for these two outbreaks stabilized after ~20 hours of sequencing for ONT R9 and ~8 hours for ONT R10. This study provides a proof of concept for using ONT R10, either in isolation or in combination with Illumina, for rapid and accurate bacterial SNP-based outbreak investigation.

[Open access here](#)

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 •

