

NATIONAAL
REFERENTIE
CENTRUM

LISTERIA
MONOCYTOGENES

Jaarverslag 2017

Sciensano
Infectieziekten mens - Bacteriële ziekten
NRC *Listeria monocytogenes*

Oktober 2020 • Brussel • België

—
VAN DEN BOSSCHE AN

•

MATTHEUS, WESLEY

•

CEYSSENS, PIETER-JAN

An Van den Bossche, Ph.D. • T+32 (0)2 373 31 19 • An.vandenBossche@siensano.be

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 *Listeria monocytogenes*, Jaarverslag 2017. 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 HUMANE LISTERIA

- In 2017 ontving het Nationale Referentie Centrum 74 *Listeria monocytogenes* isolaten afkomstig van unieke patiënten. Dit komt overeen met een incidentie van 0.65/100 000 inwoners, wat relatief hoog is in vergelijking met het Europese gemiddelde van 0.42/100 000 inwoners. Zoals in andere Europese landen is er de laatste jaren een licht stijgende trend in Listeriose gevallen.
- Van de 74 gevallen, waren er 10 perinatale listeriosen. Dit is het hoogste aantal sinds 2010. In 4 gevallen had de infectie een in uterus overlijden van de foetus tot gevolg. In 3 gevallen veroorzaakte de infectie een vroeggeboorte.
- Bij de 64 niet-perinatale listeriose gevallen waren de meest voorkomende symptomen sepsis (56,3%), meningitis (6,3%) of een combinatie van beiden (7,8%). Er werden 4 overlijdens gerapporteerd. Dit laatste is waarschijnlijk een onderschatting van de reële cijfers.
- Van de 64 niet-perinatale listeriose gevallen, werden 57,8% van de gevallen geïsoleerd bij mannen en 40,6% bij vrouwen. 78,6% van de gevallen waren ouder dan 60 jaar en in 50% van de gevallen werd er een onderliggende aandoening gerapporteerd, waarbij kanker (28,1%), spijsvertering geassocieerde aandoeningen (21.9%) en cardiovasculaire aandoeningen (15.6%) het meest voorkomend waren.
- Net als voorbije jaren werden voornamelijk *Listeria* stammen met serotype 4b (35,1%) en 1/2a (44,6%) geïdentificeerd. Hierbij blijft serotype 4b de laatste jaren stabiel, terwijl serotype 1/2a meer fluctueert.
- Alle *Listeria* stammen waren gevoelig voor de 10 geteste antibiotica op twee uitzonderingen na. (1) Er werd één stam geïdentificeerd met resistentie tegen Trimethoprim + Sulfamethoxazole. (2) 18 van 74 stammen vertoonden een intermediaire resistentie voor chlooramfenicol
- Binnen de serogroep IVb werd er de laatste jaren een daling van het clonaal complex CC1 waargenomen, terwijl de aantallen van CC6 stabiel bleven en CC2 en CC4 zijn toegenomen. Binnen serogroep IIa was er voornamelijk een sterke daling van CC8 en sterke toename van CC37 en CC155. Deze toenames konden niet in verband gebracht worden met een specifieke cluster of uitbraak.
- Na clustering op basis van cgMLST, werden in 2017 vijf cluster geïdentificeerd. In vier gevallen, ging het om een kleine cluster van 2 stammen, en één cluster betrof 3 stammen.
- In 2017 werden er geen Belgische stammen gelinkt aan Europese uitbraken. Eveneens werd er in België geen melding gemaakt van voedselvergiftigingen veroorzaakt door *L. monocytogenes*.

INHOUDSTAFEL

CONTENTS

●	HOOFDPUNTEN HUMANE LISTERIA	4
●	1. INLEIDING	6
	1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	6
	1.2. Doelstelling	6
	1.3. Kwaliteit	6
●	2. METHODOLOGIE	8
	2.1 Defentities	8
	2.2 Verzamelen van stammen en metadata	8
	2.3 Identificatie	8
	2.4 Serotypering	8
	2.5 Antibioticumresistentie	9
	2.6 Moleculaire typering	9
●	3. RESULTATEN ROUTINEANALYSEN	10
	3.1 Staalcollectie & epidemiologie	10
	3.2. Serotype distributie	12
	3.3. Antibioticumresistentie	13
	3.4. Moleculaire typering & Uitbraken	13
●	4. ONDERZOEK EN ONTWIKKELING	17
	4.1 Uitbraken en studies	17
	4.2 Lopende projecten	17
	4.3 Nieuwe Belac-geaccrediteerde procedures	17
	4.4 Peer-reviewed publicaties	17
●	5. REFERENTIES	18

1. INLEIDING

1.1. LISTERIA MONOCYTOGENES

Listeriose is een infectie veroorzaakt door de bacterie *Listeria monocytogenes*. Deze bacteriële aandoening komt voornamelijk voor bij personen met een verzwakt immuunsysteem (ouderen, immuungedeprimeerde personen, zwangere vrouwen en neonati). Het algemeen klinische beeld van een listeriose is een infectie van het centrale zenuwstelsel en/of sepsis/bacteriëmie. In het geval van een zwangerschap kan een spontane abortus of een vroeggeboorte optreden.

In het merendeel van de gevallen gebeurt de overdracht van *L. monocytogenes* via de voeding. De gevallen komen meestal geïsoleerd voor maar kunnen ook een epidemisch karakter hebben. De ziekte heeft een lage incidentie, maar gezien de ernst van de aandoening (mortaliteit in 20 tot 30% van de gevallen) moet het toch van nabij opgevolgd worden als een belangrijk probleem voor de volksgezondheid.

De bacteriën van het genus *Listeria* zijn grampositief en mobiel. Het zijn geen sporenvormers en ze zijn niet zuurvast. De primaire habitat is de leefomgeving, waarbij de kiem zeer resistent is tegen extreme leefcondities zoals bijvoorbeeld een lage temperatuur en lage/hoge pH.

Er zijn 20 species van *Listeria* beschreven, verdeeld in twee groepen: *Listeria sensu stricto* en *Listeria sensu lato*. Enkel *Listeria monocytogenes*, dat deel uit maakt van de eerste groep, wordt als pathogeen voor de mens beschouwd. Toch werden er ook al enkele zeldzame gevallen gerapporteerd van humane infecties veroorzaakt door *Listeria ivanovii*, terwijl dit species normaal gelinkt wordt aan dierlijke listeriosis [1,2].

Het specie *L. monocytogenes* wordt onderverdeeld in 13 erkende en internationaal gebruikte serotypes, nl. 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e en 7. Het merendeel van de stammen die in België worden geïsoleerd behoren tot de serotypes 1/2a en 4b. Een overzicht van de diversiteit van *L. monocytogenes* stammen van humane en voedingsoorsprong in België van 1985 tot 2014 wordt beschreven in de publicatie Bertrand et al. 2016 [3].

1.2. DOELSTELLING

De belangrijkste opdracht van het Nationaal Referentie Centrum voor *Listeria* is het verzekeren van een epidemiologisch toezicht op humane *Listeria monocytogenes* infecties. 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.

Daarnaast worden er ook *Listeria* stammen, geïsoleerd uit levensmiddelen, geserotypeerd. Hierdoor kan een eventueel verband tussen de contaminatiebron en de humane uitbraak vastgesteld worden. De moleculaire surveillance van *Listeria monocytogenes* wordt bekomen

door het uitvoeren van Whole Genome Sequencing (WGS) voor elke humane stam. Aan de hand van deze analyse wordt elke stam gesubtypeerd, nl. door het bepalen van het core genome MultiLocus Sequence Type (cgMLST). Het NRC houdt eveneens toezicht op de antibioticagevoeligheid van de geïsoleerde kiemen.

Het NRC werkt nauw samen met de dienst “Epidemiologie van infectieziekten” van Sciensano, dat jaarlijks een lijst van het NRC ontvangt met de bevestigde humane infecties met *Listeria*. Deze gegevens worden vervolgens doorgegeven aan het netwerk Food and Waterborne Diseases and Zoonoses (Europese organisatie voor enterische infecties van het ECDC). De epidemiologische gegevens zijn, met beperkte toegang, op de databank van Sciensano te raadplegen door de gezondheidsinspecteurs van de Gemeenschappen. De algemene tendensen zijn publiek beschikbaar via <https://epistat.wiv-isp.be/dashboard/>.

Wanneer er een uitbraak vermoed wordt, waarschuwt het NRC de dienst “Epidemiologie van infectieziekten” en de gezondheidsinspecteurs van de betrokken gemeenschappen, zodat een onderzoek bij de patiënten kan opgestart worden. Bovendien wordt het FAVV (Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen) ingelicht voor een onderzoek van de mogelijk besmette eetwaren. Uitbraken worden eveneens Europees gemeld aan ECDC via het platform “EPIS FWD” (Epidemec Intelligence Information System – Food and Waterborne Diseases and Zoonoses).

Dit toezicht laat toe uitbraken te controleren, preventiemaatregelen uit te stippelen en de genomen maatregelen ten gunste van de volksgezondheid en voor de bescherming van de consument te evalueren.

1.3. KWALITEIT

De eenheid Gastro-intestinale ziekten en Bacteriële meningitis heeft meer dan 50 jaar ervaring met de identificatie en serotypering van *L. monocytogenes*. Het NRC streeft hierbij naar een hoge kwaliteitsstandaard, 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 2012 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

INLEIDING

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. Deze laten het Centrum 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 DEFINITIES

Een listeriose wordt klinisch gedefinieerd als de aanwezigheid van minstens één van volgende vijf symptomen: koorts, meningitis/encefalitis, griepachtige symptomen, sepsis en/of lokale infecties zoals artritis, endocarditis en abces. In het geval van een zwangerschap wordt een listeriose geassocieerd met een miskraam, doodgeboorte (na 20 weken), of premature geboorte (vroeger dan 37 weken).

De lab-definitie van een listeriose omvat een humane infectie waarbij de bacterie *Listeria monocytogenes* wordt geïsoleerd uit een kweek van een in regel steriele site. Op basis van onderstaande definities worden listeriosen in twee types geclassificeerd.

- **Perinatale listeriose (PNL)** is een geval waarbij *L. monocytogenes* wordt geïsoleerd uit een kweek bij een zwangere vrouw, uit een perinataal staal afgenomen bij de geboorte of uit een staal van een neonatus (≤ 28 dagen). In dit geval kan de site ook van niet-steriele origine zijn zoals placenta weefsel, amnionvocht, een vaginale swab of meconium. De moeder en het kind worden als een enkele casus beschouwd.
- **Niet-Perinatale listeriose (n-PNL)** is een geval waarbij *L. monocytogenes* wordt geïsoleerd uit een kweek van een in regel steriele site bij een volwassene (met uitzondering van de zwangere vrouw) of in zeldzame gevallen uit een staal van een kind ouder dan 28 dagen.

2.2 VERZAMELEN VAN STAMMEN EN METADATA

Elke isolatie van een humane *L. monocytogenes* stam door klinische laboratoria wordt 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 geassocieerde ziektebeeld en informatie i.v.m. recente reizen, onderliggende ziekten en de evolutie van de patiënt of zwangerschap in het geval van perinatale gevallen. 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 S17BD0xxxx, en wordt de opgenomen metadata digitaal ingebracht in het STARLIMS-systeem. Het analyseverslag met bacteriële identificatie, serotypering en antibioticumresistentieprofiel worden aan het klinische

laboratorium gerapporteerd. Het staal wordt na analyse bewaard in een collectie in 20% glycerol op -80°C .

In Brussel en Wallonië is listeriose een meldingsplichtige ziekte. Elk geconfirmeerd geval van *L. monocytogenes* wordt daarom door het NRC aan de bevoegde gezondheidsinspecteurs gerapporteerd.

2.3 IDENTIFICATIE

De genus *Listeria* bestaat uit 20 species waarvan 7 gekenmerkt worden door een positieve mobiliteitstest: alle 6 species uit de groep *Listeria sensu strictu* (*Listeria monocytogenes*, *Listeria marthii*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*) en *Listeria grayi*. Deze species worden verder van elkaar onderscheiden aan de hand van vijf biochemische tests: hemolytische activiteitstest, fosfatidylinositol-specifieke phospholipase C (PI-PLC) activiteitstest en fermentatie van mannitol, xylose en rhamnose [4].

In het geval van twijfel, kan *L. monocytogenes* geïdentificeerd worden via MALDI-TOF (Biotyper, Brüker) of een in-house ontwikkelde PCR (zie 2.4).

Voor de detectie van niet-cultiveerbare stammen vanuit steriele omgeving (bloed, lumbaal vocht) wordt gebruik gemaakt van Real Time-PCR (RT-PCR) (Taqman qPCR Master mix, Diagenode), vanaf een DNA-extract van het staal. Hierbij wordt de detectie van 2 genen gecontroleerd, *hey* en *lip* zoals beschreven in de publicaties van Garrison (2013) en Le Monnier (2011) [5,6].

2.4 SEROTYPERING

Het serotype van een *L. monocytogenes* wordt bepaald door een combinatie van somatische O-antigenen en flagellaire H-antigenen. Momenteel zijn er 13 erkende serotypes: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e en 7. Serotypering gebeurt aan de hand van klassieke agglutinatie testen [7], gebruikmakende van antisera gemaakt door Denka Seiken en verdeeld via Forlab.

Tabel 1. Serogroepen van *L. monocytogenes*.

Serogroep	Serotypes
IIa	1/2a, 3a
IIb	1/2b, 3b, 7
IIc	1/2c, 3c
IVa	4a, 4c
IVb	4b, 4d, 4e, 4ab

Wanneer serotypering niet mogelijk is of geen éénduidig resultaat oplevert, wordt een serogroepering uitgevoerd via een in-house PCR. Hierbij wordt de aanwezigheid van 6

genen onderzocht: *prfA*, *prs*, lmo0737, lmo1118, ORF2110, ORF2819 [8,9]. De beschreven serogroepen omvatten meerdere serotypes en worden weergegeven in Tabel 1.

2.5 ANTIBIOTICUMRESISTENTIE

Het NRC test de antibioticumgevoeligheid van humane *L. monocytogenes* stammen voor 10 antibiotica, gebruikmakend van commerciële E-tests (Biodisk) volgens de aanwijzingen van de producent. De interpretatie gebeurt volgens de aanbeveling van het “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) en “Clinical & Laboratory Standards Institute” (CLSI). De testrange en breekpunt-concentraties worden weergegeven in tabel 2.

Tabel 2. Antibioticumgevoeligheid testing via E-tests: Test range en breekpunten (µg/ml).

S = gevoelig / I = intermediair / R = resistent
* CLSI M45A2 / ** EUCAST

	Range	S	I	R
Ampicilline**	0.016 – 256	≤ 1		> 1
Gentamicine*	0.016 – 256	≤ 4	8	> 16
Amoxicilline*	0.016 – 256	≤ 4	> 4 - ≤ 16	> 16
Ciprofloxacine*	0.002 – 32	≤ 1	2	> 4
Chlooramfenicol*	0.016 – 256	≤ 8	16	> 32
Streptomycine*	0.064 – 1024	≤ 8	> 8 - ≤ 16	> 16
Vancomycine*	0.016 – 256	≤ 4	8 – 16	> 32
Erythromycine**	0.016 – 256	≤ 1		> 1
Tetracycline*	0.016 – 256	≤ 4	8	> 16
Trimethoprim ** +sulfamethoxazole	0.002 - 32	≤ 0.06		> 0.06

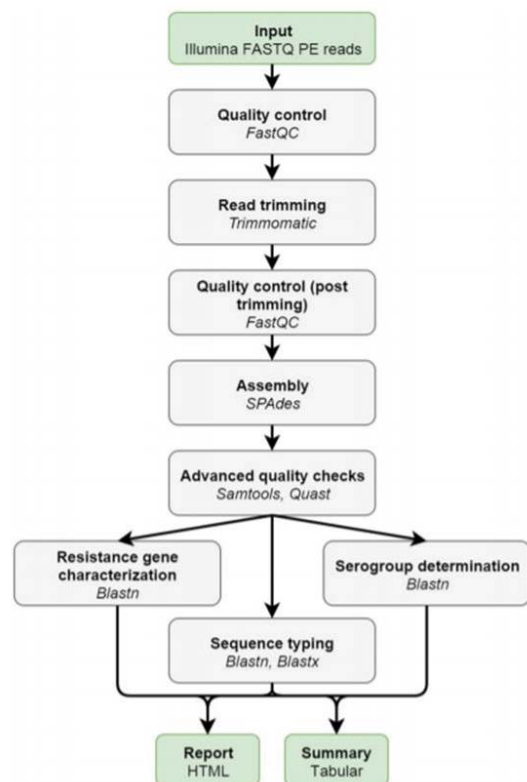
2.6 MOLECULAIRE TYPERING

Historisch werden humane *L. monocytogenes* stammen moleculair gekarakteriseerd via twee klassieke methoden: (1) Multilocus sequence typing (MLST), waarbij aan de hand van de sequentie van 7 huishoudgenen een sequence type (ST) wordt toegekend; en (2) Pulse Field Gel Electroforese (PFGE), waarbij restrictiepatronen na DNA-digestie met de enzymen Apal en Ascl worden vergeleken (pulsovars).

Sinds 2016 werd er aan het NRC echter overgeschakeld op Whole Genome Sequencing (WGS). Het DNA van elke stam wordt geëxtraheerd. WGS wordt uitgevoerd met MiSeq (Illumina) op basis van een Nextera library prep. Voor de *in silico* analyse van de data werd een op maat gemaakte pipeline ontwikkeld (Galaxy), weergegeven in figuur 1. Het eerste deel van de analyse bestaat uit een kwaliteitscontrole, “read trimming” en assemblage van de sequentie. Dit proces werd in 2018 gevalideerd door de succesvolle deelname aan de “Proficiency test for *Listeria monocytogenes* whole genome assembly” georganiseerd door ECDC [10]. Vervolgens kunnen onder andere volgende bio-informatische assays uitgevoerd worden: (1) karakterisatie van de resistentie-genen, (2) typering via

klassieke MLST en core genome MLST (cgMLST), en (3) serogroep bepaling.

Bij cgMLST wordt de sequentie van 1748 kerngenen (loci) bepaald [11], waarbij elke unieke sequentie een uniek allelnummer krijgt toegekend. Aan de hand van het bekomen cgMLST profiel worden clusteranalyses uitgevoerd om het verwantschap tussen stammen na te gaan. Dit verwantschap wordt uitgedrukt in “Allelic Difference” (AD), zijnde het aantal loci met een verschillend allelnummer.



Figuur 1. Overzicht van de Bio-informatische workflow voor Whole Genome sequencing.

3. RESULTATEN ROUTINEANALYSEN

HUMANE LISTERIA MONOCYTOGENES

3.1 STAALCOLLECTIE & EPIDEMIOLOGIE

In 2017 werden 149 humane stalen naar het NRC Listeria gestuurd. Van de 70 niet-cultiveerbare stalen (Lumbaal vocht, bloed, serum) die opgestuurd werden ter detectie van *L. monocytogenes*, werd geen enkel staal positief bevonden voor de aanwezigheid van *L. monocytogenes*.

In totaal werden de stammen van 74 unieke gevallen van listeriose opgestuurd naar het NRC en werd de identificatie van *L. monocytogenes* bevestigd. Dit komt overeen met een incidentie van 0.65 gevallen/ 100 000 inwoners. Deze incidenties zijn relatief hoog in vergelijking met andere EU-landen (gemiddeld 0.42 gevallen/ 100 000 inwoners), maar zijn in lijn de stijgende trend aan listeriose gevallen die de laatste 20 jaar wordt vastgesteld in België en andere landen van de EU (Figuur 2a) [12].

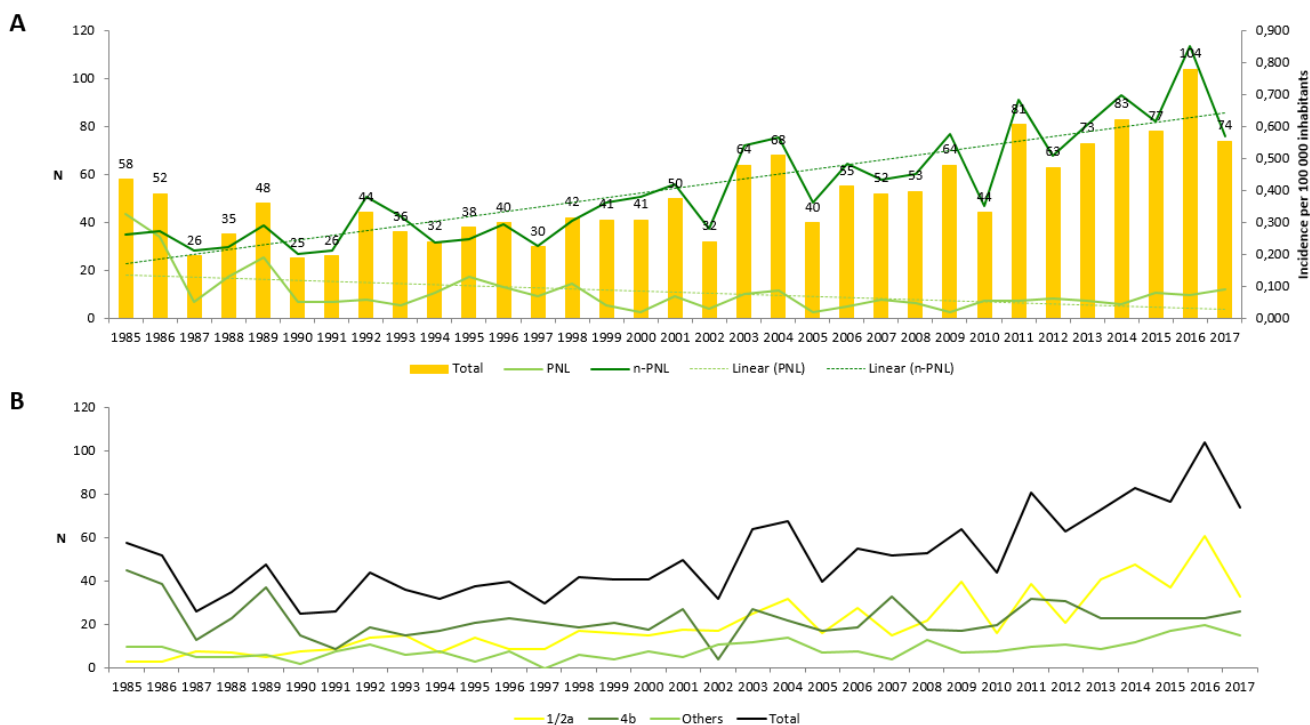
Deze stijgende trend is voornamelijk te wijten aan een toename in n-PNL gevallen. In 2017 werden 10 perinatale listeriose gevallen en 64 niet-perinatale gevallen gedetecteerd (Figuur 2a). Aangezien *L. monocytogenes* voornamelijk ouderen treft (zie 3.1.3), is de stijging mogelijks te wijten aan de toenemende fractie aan oudere personen in de bevolkingspopulatie.

3.1.1 SPECIMEN

De grootste fractie van *Listeria* stammen werd geïsoleerd uit bloed (75,7%). Daarnaast werden ook stammen geïsoleerd uit lumbaal vocht (6,8%), feces (1,4%), urine (1,4%) en etter (4,1%). In twee perinatale gevallen waren de stammen afkomstig uit een urethraal/vaginaal secreet (Tabel 3).

Tabel 3. Oorsprong van de isolaten.

SPECIMEN	N (PNL)	N (n-PNL)	N (Totaal)	%
Bloed	4	52	56	75.7%
Lumbaalvocht	1	4	5	6.8%
Feces	0	1	1	1.4%
Urine	0	1	1	1.4%
Etter	0	3	3	4.1%
Urethraal/vaginaal secreet	2	0	2	2.7%
Andere/ onbekend	3	3	6	8.1%
Totaal	10	64	74	100.0%



Figuur 2. Overzicht van het aantal Listeriose gevallen bevestigd aan het NRC Listeria.

A. Absoluut aantal en incidentie van *L. monocytogenes* geconfirmeerd van 1985 tot 2017. B. Absoluut aantal listeriosen per serotype, van 1985 tot 2017.

3.1.2 KLINISCHE PATHOLOGIE, ONDERLIGGENDE ZIEKTEN EN OVERLIJDENS

Perinatale gevallen

In 2017 werden 10 perinatale listeriose gevallen bevestigd aan het NRC. Hoewel het aantal PNL-gevallen sinds 2000 drastisch gedaald is omwille van actieve preventiecampagnes bij zwangere vrouwen, werd in 2017 het hoogste aantal perinatale gevallen genoteerd sinds 2010: 13.5% van het totaal aantal gevallen t.o.v. 7.7% in 2016, 11.5% in 2015, 6% in 2014, 8.2% in 2013, 11.2% in 2012 en 7.4% in 2011 (Figuur 2a). Dit wijst erop dat er nog steeds een nood is aan het behoud van deze actieve campagnes bij zwangere vrouwen.

Bij 2 gevallen werd bij de moeder een sepsis vastgesteld en in 2 gevallen een chorioamnionitis (bacteriële infectie van de foetale membranen). In 3 gevallen leidde de listeriose tot een premature bevalling. Bovendien veroorzaakte de infecties in 4 gevallen een spontane abortus of doodgeboorte. Dit is eveneens het hoogste absolute aantal sinds 2010 (Tabel 4). Hierbij moet steeds rekening gehouden worden met het feit dat niet voor elk gerapporteerd geval alle metadata aan het NRC aangeleverd worden.

Bij één pasgeborene werd een sepsis vastgesteld en bij één pasgeborene meningitis.

Tabel 4. Gevolgen van perinatale infecties.

JAAR	Vroeg-geboorte	Overlijden in utero	Overlijden na geboorte	Onbekend	N (PNL)
2010	0	1	0	5	6
2011	0	3	1	2	6
2012	0	3	0	4	7
2013	1	1	0	4	6
2014	2	1	0	2	5
2015	7	1	0	0	8
2016	3	2	0	3	8
2017	3	4	0	3	10

Niet-perinatale gevallen

Bij de niet-perinatale gevallen zijn sepsis (56.3%), meningitis (6.3%) of een combinatie van beiden (7.8%) de meest voorkomende aandoeningen (Tabel 5). In 3 gevallen werden andere aandoeningen gerapporteerd zoals een pneumonie, een geïnfecteerde prothese en griepachtige symptomen. In 25% van de gevallen, werden geen klinische gegevens vermeld.

Er werden 4 overlijdens genoteerd (6.25% van de niet-perinatale gevallen), wat vergelijkbaar is met de aantallen van de voorbije jaren (1 tot 6 overlijdens). Er dient opgemerkt worden dat dit waarschijnlijk een onderschatting is door een onder rapportering aan het NRC. Europees werd er in 2017 een mortaliteit van 13,7% van de listeriosis gevallen gerapporteerd aan ECDC [12].

Tabel 5. Pathologie niet-perinatale gevallen.

Pathologie	N (n-PNL)	% (n-PNL)
Sepsis	36	56.3%
Meningitis	4	6.3%
Sepsis + Meningitis	5	7.8%
Andere	3	4.7%
Onbekend	16	25.0%
Totaal	64	100.0%

Voor 32 van de 64 niet-perinatale gevallen (50%), werd een onderliggende aandoening gerapporteerd aan het NRC (Tabel 6). De meest voorkomende aandoeningen zijn kanker (28,1%), spijsvertering geassocieerde aandoeningen (21.9%) en cardiovasculaire aandoeningen (15.6%). Dit hoge percentage aan onderliggende aandoening demonstreert dat voornamelijk personen met een gecompromiteerd immuunsysteem vatbaar zijn voor een *Listeria* infectie.

Tabel 6. Onderliggende aandoeningen bij niet-perinatale gevallen.

Onderliggende aandoening	N (n-PNL)	% (n-PNL)
Kanker	9	28.1%
Digestieve aandoeningen	7	21.9%
Cardiovasculaire aandoeningen	5	15.6%
Iatrogene immunosuppressie	1	3.1%
Immunosuppressie	4	12.5%
Nieraandoeningen	2	6.3%
Respiratoire aandoeningen	3	9.4%
Alcoholisme/cirrose	0	0.0%
Chirurgie	1	3.1%
Infecties	0	0.0%
Transplantatie	0	0.0%
Onbekend	32	50.0%
Totaal	64	100.0%

3.1.3 LEEFTIJD- EN GESLACHTSDISTRIBUTIE

Perinatale gevallen

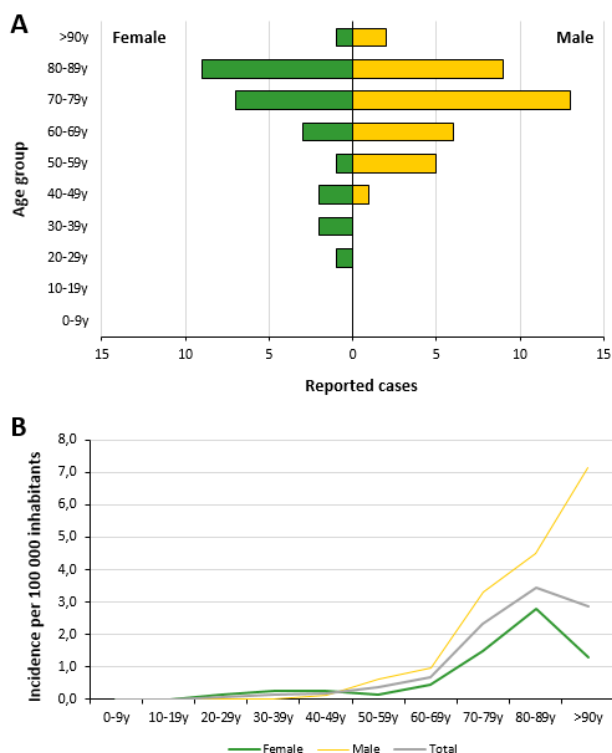
Voor de perinatale gevallen is de gemiddelde leeftijd van de moeder 31,6 jaar.

Niet-perinatale gevallen

Niet-perinatale listeriosen komen het vaakst voor in de oudere groepen van de bevolking (Figuur 3). 78,1% van de gevallen zijn ouder dan 60 jaar, met een gemiddelde leeftijd van 71,2 jaar. Dit ligt in lijn met de voorbije jaren, waar de gemiddelde leeftijd tussen 65,2 en 72,7 jaar varieerde. Dit bevestigt dat leeftijd een risicofactor is voor *Listeria* infecties. Een reden hiervoor is dat oudere personen vaker onderliggende aandoeningen hebben (zie 3.1.2).

57,8% van de geconfirmeerde niet-perinatale listeriose gevallen werden geïsoleerd bij mannen t.o.v. 40,6% bij vrouwen (ratio 1,42). Voor één geval werd het geslacht niet gerapporteerd aan het NRC. In overeenstemming met deze

aantallen is de incidentie bij mannen hoger (0.66 gevallen per 100 000 inwoners) dan bij vrouwen (0.45 gevallen per 100 000 inwoners). Vooral bij oudere mannen stellen we hoge incidenties vast met 3,32 gevallen/100 000 inwoners in de leeftijdscategorie 70-79 jaar, 4,51 gevallen/100 000 inwoners in de categorie 80-89 jaar en zelfs 7,14 gevallen/100 000 bij mannen ouder dan 90 jaar.

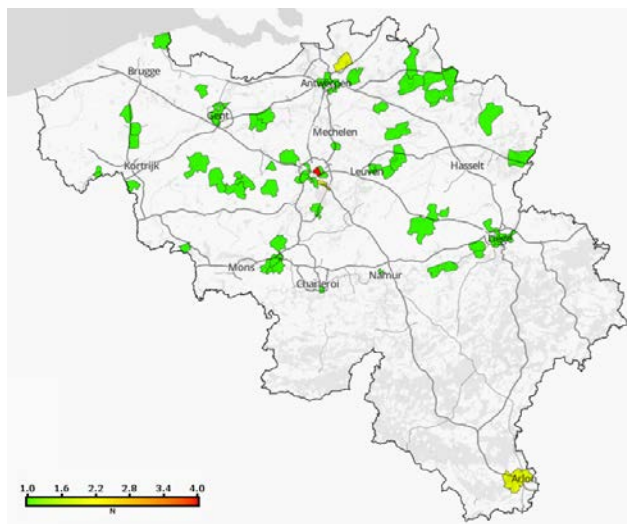


Figuur 3. Distributie van niet-perinatale listeriose gevallen per geslacht en leeftijdsgroep, in 2017.
A. Leeftijdspiramide van bevestigde niet-perinatale listeriosen. **B.** Incidentie (per 100 000 inwoners) per leeftijdsgroep.

Deze cijfers zijn in overeenstemming met de Europese gemiddelden waarbij 55,2% van de gevallen bij mannen werden geïdentificeerd t.o.v 44,5% bij vrouwen. In Europa waren 67,1% van de gevallen ouder dan 65 jaar [12].

3.1.4 GEOGRAFISCHE DISTRIBUTIE

Figuur 4 is een weergave van het absolute aantal gerapporteerde listeriose gevallen per gemeente. Op basis van geografie zijn er geen clusters waar te nemen, en gaat het vermoedelijk om geïsoleerde gevallen.



Figuur 4. Spreiding van het absolute aantal listeriose gevallen per gemeente, in 2017.
 Gegevens worden geregistreerd per woonplaats van de patiënt. Kaart gemaakt via Gemeentekaart.be

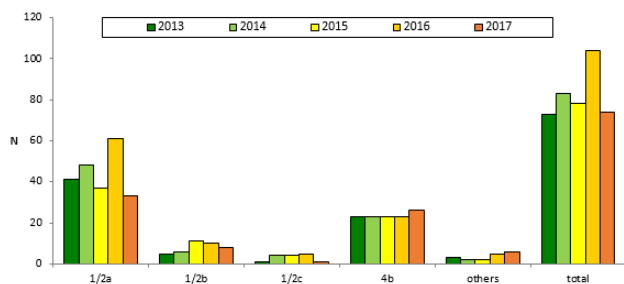
3.2. SEROTYPE DISTRIBUTIE

In tabel 6 wordt een overzicht gegeven van de distributie van de geïdentificeerde *L. monocytogenes* serotypes in 2017. Zoals de voorbije jaren, zijn de serotypes 1/2a en 4b de meest voorkomende serotypes in België, met respectievelijk 33 (44.6%) en 26 (35.1%) gevallen. Zoals vermeld in 2.4 wordt voor stammen waarbij klassieke serotyping niet éénduidig is, een moleculaire serogroepering uitgevoerd. Omdat serogroepen meerdere serotypes bevatten (Tabel 1), worden zij in de tabel 7 apart weergegeven.

Tabel 7. Distributie serotypes *L. monocytogenes*.

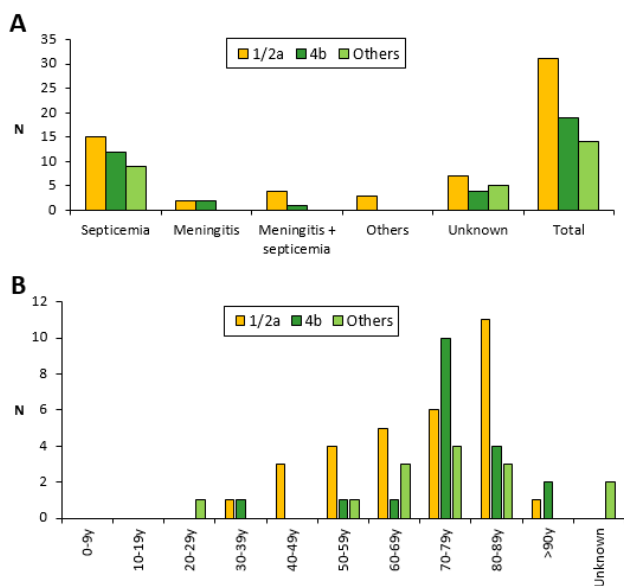
SEROTYPE	PNL	n-PNL	N	%
1/2a	2	31	33	44.6%
1/2b		8	8	10.8%
1/2c		1	1	1.4%
3a		1	1	1.4%
4b	7	19	26	35.1%
IIa	1	2	3	4.1%
IIb		1	1	1.4%
IVb		1	1	1.4%
Totaal	10	64	74	100.0%

Wanneer de frequentie van de serotypes wordt vergeleken met de voorbije jaren, wordt vastgesteld dat de prevalentie van serogroep 4b de laatste jaren vrij stabiel blijft. De stijgende trend aan listeriose gevallen is voornamelijk te wijten aan fluctuaties in de prevalentie van serotype 1/2a (Figuur 2b & 5).

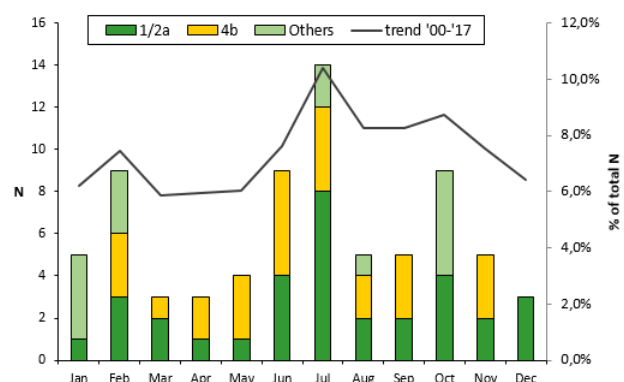


Figuur 5. Distributie van de serotypes de voorbije 5 jaar. Absolute aantal van de serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b en andere.

In figuur 6 wordt de distributie van de serotypes van de niet-perinatale gevallen bekeken per pathologie en per leeftijdscategorie. Hoewel er een in de leeftijdscategorieën 70-79 jaar en 80-89 jaar resp. een groter aantal aan 4b en 1/2a isolaten werden geïdentificeerd, is dit geen significante link. De verdeling van de serotypes over de verschillende categorieën zijn bijgevolge in verhouding met de prevalentie van het desbetreffende serotype, de pathologie of de leeftijdscategorie.



Figuur 6. Distributie van de serotypes van de niet-perinatale gevallen in 2017. A. Distributie per pathologie B. Distributie per leeftijdscategorie



Figuur 7. Distributie van de serotypes per maand in 2017.

In figuur 7 wordt de maandelijkse distributie van het aantal *Listeria* infecties weergegeven per serotype. De infecties komen verspreid over het hele jaar voor, met in de zomermaanden een kleine piek (zie trendlijn 2000-2017). Ook in 2017 is eenzelfde verdeling zichtbaar. Eveneens is het voorkomen van specifieke serotypes gelijkmatig verdeeld over het hele jaar. Toch valt een piek van serotype 1/2a op in de maand juli. Na clusteranalyse (zie 3.4) kan worden uitgesloten dat het hier gaat om een uitbraak van gelinkte gevallen.

3.3. ANTIBIOTICUMRESISTENTIE

L. monocytogenes vertoont intrinsieke resistentie tegen derde generatie cefalosporines, eerste generatie quinolonen, fosfomycine en nalidixinezuur [13,14]. Verworven resistenties tegen andere antibiotica blijft voorlopig gelukkig nog steeds laag. Standaard wordt een listeriose behandeld met ampicilline/amoxicilline, en omwille van het synergetisch effect, vaak gecombineerd met een aminoglycoside zoals gentamicine [15,16]. In geval van intolerantie tegenover β -lactams wordt trimethoprim-sulfamethoxazol toegediend [16].

Alle listeria isolaten die naar het NRC worden gestuurd, worden getest op antimicrobiële gevoeligheid t.o.v. 10 antibiotica (zie 2.5). Zoals de voorbije jaren zijn de meeste isolaten gevoelig voor alle geteste antibiotica. Hierbij zijn in 2017 twee uitzonderingen (Figuur 8).

- Zo vertonen 18 van de 74 stammen een intermediaire resistentie voor chlooramfenicol. Dit is in lijn met de observatie van de voorbije jaren, waarbij de MIC50 steeg van 4 μ g/ml naar 8 μ g/ml en de MIC90 van 4 naar 12 μ g/ml.
- Voor één stam werd een resistentie tegen Trimethoprim + Sulfamethoxazole genoteerd. Dit werd voor het laatst geobserveerd in 2008.

Genetische oorzaken van deze (intermediaire) resistenties konden niet vastgesteld worden (op basis van WGS, zie 2.5).

3.4. MOLECULAIRE TYPERING & UITBRAGEN

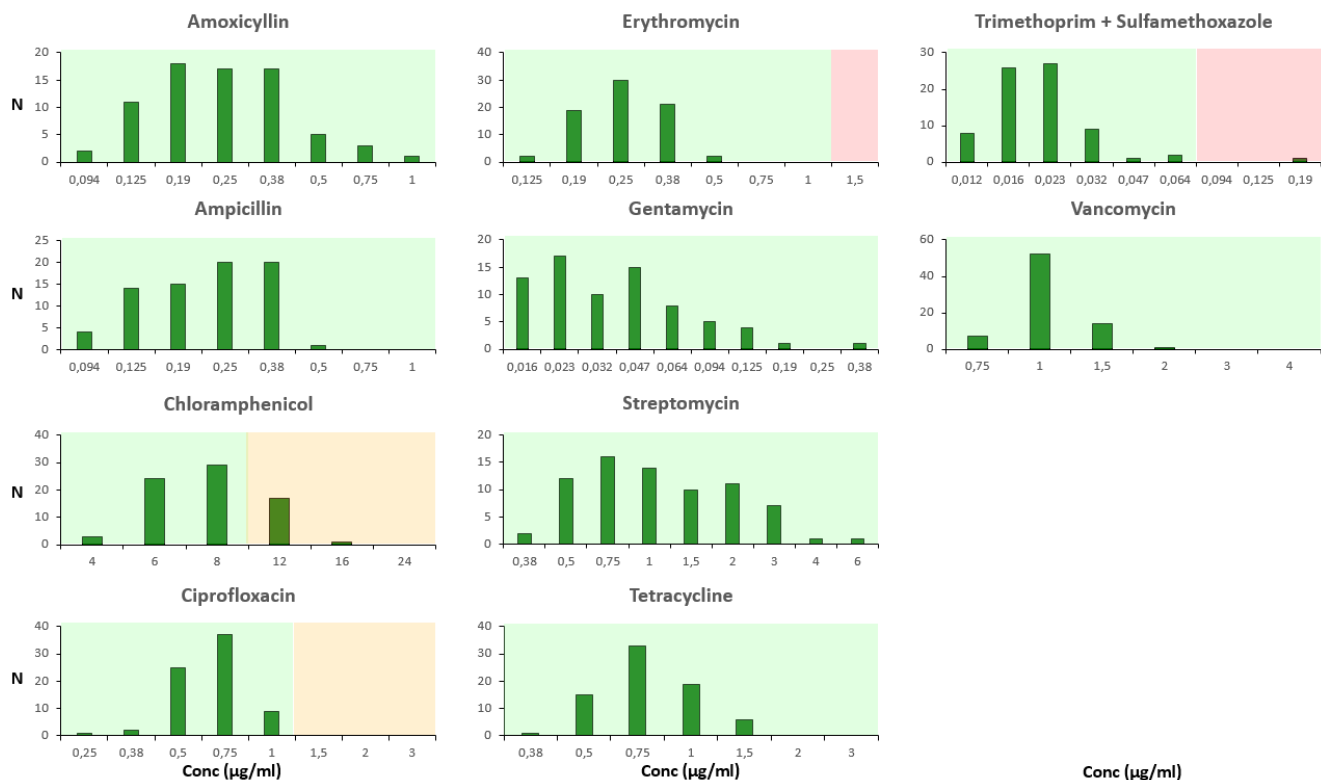
Sinds 2016 worden alle stammen die naar het NRC opgestuurd worden geanalyseerd via WGS. Op basis van deze WGS-data kunnen verschillende moleculaire analyses en typeringen uitgevoerd worden.

Uit de ruwe WGS-data werd eerst het klassieke 7-genen MLST-profiel en bijhorend clonaal complex van elk isolaat geëxtraheerd. In Figuur 9 wordt een overzicht gegeven van de abundantie van de meest voorkomende clonale complexen over de voorbije 5 jaar.

Binnen de serogroep IVb, zijn er vier clonale complexen die het meest voorkomen CC1, CC2, CC4 en CC6. Er wordt vastgesteld dat de abundantie van CC1 de laatste jaren is afgenomen, terwijl de abundantie van CC2 en CC4 is toegenomen.

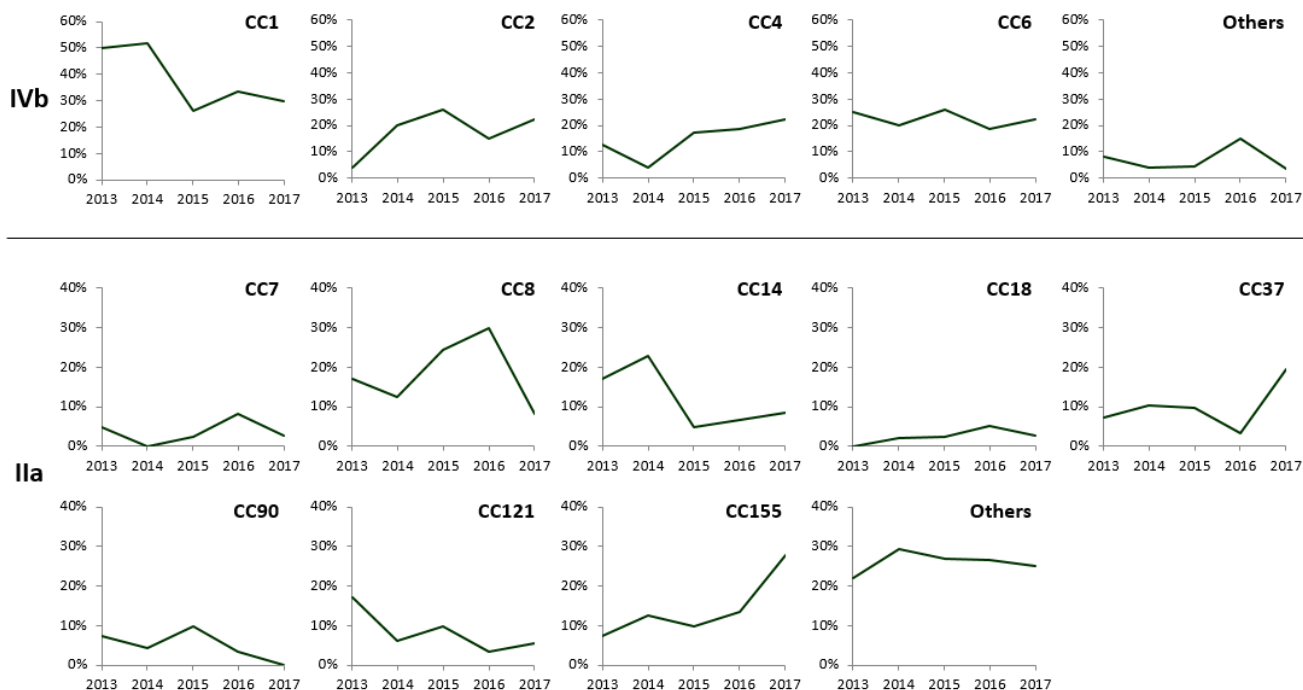
Binnen de serogroep IIa, zijn de isolaten verspreid over een groter aantal clonale complexen. De hoge abundantie van het clonale complex CC8 van de voorbije twee jaren, werd in 2017 niet meer waargenomen. Dit hoge aantal aan CC8

LISTERIA SURVEILLANCE



Figuur 8. Distributie van de antimicrobiële gevoeligheid van de stammen geïsoleerd in 2017.

Elke grafiek geeft het aantal isolaten in functie van de antimicrobiële gevoeligheid weer, per antibioticum. Groene waarden worden geclassificeerd als gevoelig, oranje waarden als intermediair, en rode waarden als resistent.



Figuur 9. Procentuele verdeling van de clonale complexen binnen de serogroepen IVb en IIa in 2013-2017.

Elke grafiek geeft de relatieve abundantie (%) weer van een clonaal complex t.o.v. het totaal aantal isolaten met respectievelijk serogroep IVb en IIa, in de loop van de voorbije 5 jaar. De meest voorkomende clonale complexen worden apart weergegeven. De clonale complexen met lage abundantie werden gegroepeerd in de groep "Others".

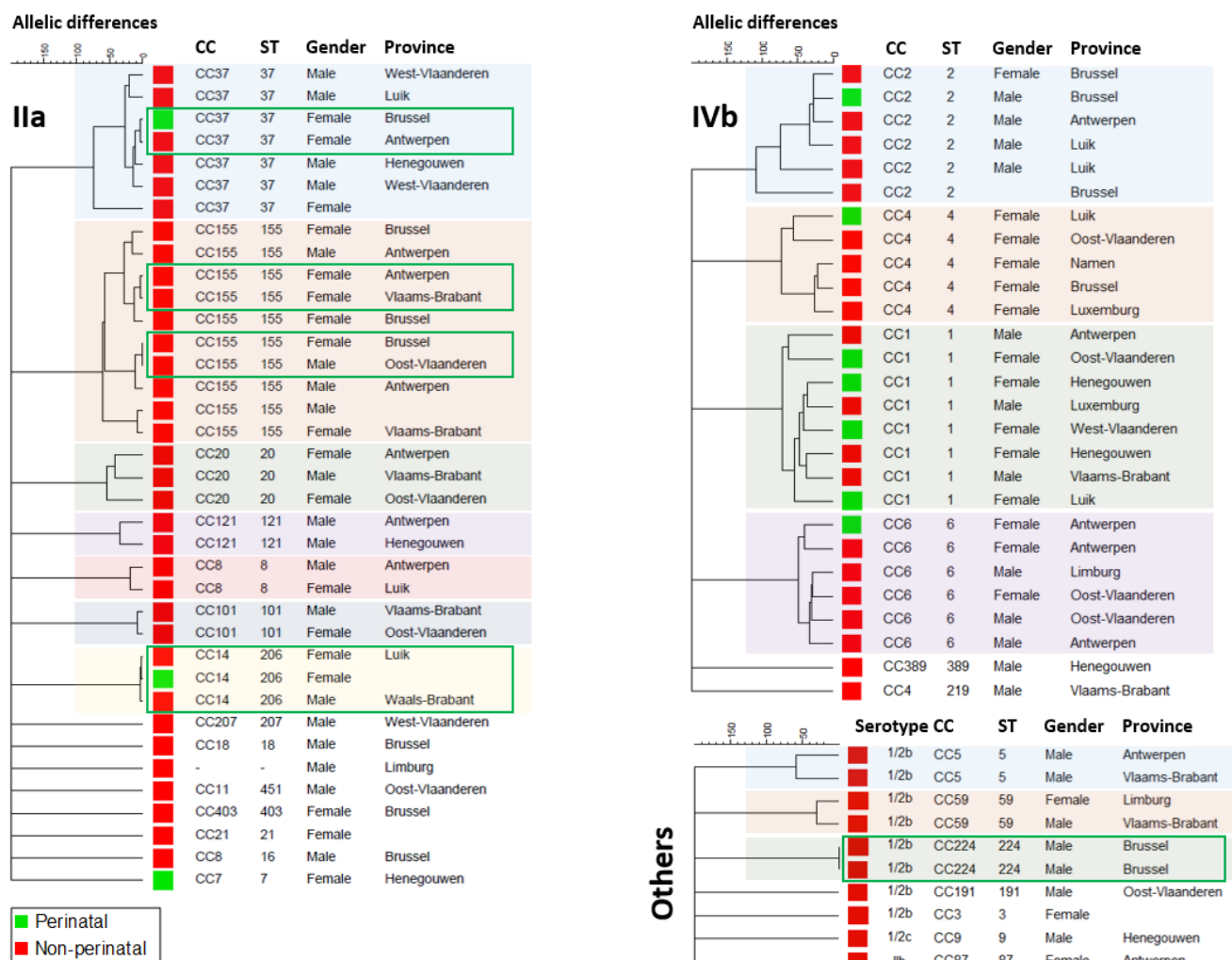
isolaten werd bij verder onderzoek gelinkt aan een listeriose uitbraak in minstens 14 EU/EEA landen (Europese Urgent Inquiry UI-492), waarbij de eerste isolaten dateren uit 2009 [17]. Hoewel er in 2017 slecht 2 isolaten werden geïdentificeerd als CC8, zijn beide isolaten na cgMLST analyse in verband te brengen met deze brede cluster aan isolaten. Een oorzaak/voedselbron werd tot nu echter nog niet geïdentificeerd voor deze uitbraak.

In 2017 werden voornamelijk hogere abundanties waargenomen voor de clonale complex CC37 en CC155. Deze gevallen werden verspreid over het hele jaar en verspreid over verschillende provincies waargenomen.

Aan de hand van cgMLST werden de isolaten in meer detail geanalyseerd (1748 genen MLST). In Figuur 10 is een dendrogram weergegeven van de cgMLST profielen van isolaten van respectievelijk serogroep IVb, Ila en de resterende groepen. Allelische verschillen groter dan 200,

worden niet aangeduid. Op de figuur is duidelijk zichtbaar dat isolaten binnen eenzelfde MLST-profiel groeperen binnen 1 tak van het dendrogram, maar het aantal allelische verschillen tussen stammen van eenzelfde profiel kan meer dan 100 zijn.

Twee isolaten worden als een cluster beschouwd wanneer er maximum 7 allelische verschillen (allellic differences, AD) tussen beide cgMLST profielen zijn [18]. In 2017 werden er 4 clusters van 2 stammen en 1 cluster van 3 stammen geïdentificeerd (Groene kaders Figuur 10). Hierbij valt op dat het verhoogde aantal aan CC37 en CC155 isolaten niet te wijten is aan een algemene uitbraak, maar dat er wel sprake is van 3 aparte clusters verspreid over de twee complexen. Geografische is er enkel een link tussen de twee gevallen van CC224 die beiden uit patiënten uit het Brussels hoofdstedelijk gewest werden geïsoleerd.



Figuur 10. Dendrogram van de cgMLST profielen binnen de serogroepen IVb en Ila in 2017.

Dendrogrammen gemaakt vanaf het cgMLST profiel (1748 genen) van elke stam geïsoleerd in 2017 voor respectievelijk de serogroepen IVb, Ila en de anderen "Others". Allelische verschillen groter dan 200 worden niet op de figuur weergegeven. Voor elk isolaat worden het geslacht (gender), MLST sequence type (ST), clonaal complex (CC) en de provincie van de patiënt weergegeven. Voor stammen die geen deel uitmaken van serogroep IVb of Ila, worden eveneens het serotype weergegeven. Stammen geïsoleerd vanaf perinatale gevallen worden voorafgegaan door een groen vierkant, stammen geassocieerd met niet-perinatale gevallen met een rood vierkant. Isolaten van hetzelfde clonale complex worden met eenzelfde kleur aangeduid. De 5 gedetecteerde clusters worden omgeven door een groen kader.

In 2017 werden er vier uitbraken gemeld aan ECDC waarbij isolaten werden geïsoleerd in meerdere Europese landen. Voor drie van deze uitbraken werd een rapport opgesteld door ECDC en EFSA (European Food Safety Agency). Dit omvatte een uitbraak gelinkt aan bevroren groenten (UI-444), een uitbraak gelinkt aan zalm uit Polen (UI-426) en een uitbraak gelinkt aan gerookte zalm in Estland (UI-452) [19–21]. In geen enkel van deze uitbraken werden er Belgische isolaten geïdentificeerd die gelinkt konden worden.

In België worden gegevens omtrent voedselvergiftigingen door verschillende instanties, zoals het FAVV en de regionale gezondheidsinspecteurs, behandeld. Al deze gegevens worden verzameld door het Nationaal Referentie Laboratorium Voedseltoxi-infecties (NRL-VTI) van Sciensano en gebundeld in een jaarrapport. Voor 2017 werden opvallend genoeg geen meldingen gemaakt van voedselvergiftigingen gelinkt aan *Listeria monocytogenes* infecties [22].

4. ONDERZOEK EN ONTWIKKELING



4.1 UITBRAKEN EN STUDIES

- Real-time opvolging van Europese uitbraken via het platform EPIS-FWD van ECDC
- Deelname aan de ELiTE II (European Listeria Typing Exercise) studiegroep, georganiseerd door ECDC en EFSA (2016-2018)

4.2 LOPENDE PROJECTEN

- Implementatie MALDI-TOF in Workflow
- Implementatie van Whole-genome sequencing in routine analyses

4.3 NIEUWE BELAC-GEACCREDITEERDE PROCEDURES

- SOP 12/MA/01/E MALDI-TOF for bacterial identification of non-mycobacterial species

4.4 PEER-REVIEWED PUBLICATIES

- Maertens de Noordhout C, Devleeschauwer B, Haagsma JA, Havelaar AH, Bertrand S, Vandenberg O, Quoilin S, Brandt PT, Speybroeck N.(2017) Burden of salmonellosis, campylobacteriosis and listeriosis: a time series analysis, Belgium, 2012 to 2020. **Euro Surveill.** 22(38) : 30615.

5. REFERENTIES

1. Orsi RH, Wiedmann M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016;100:5273–87. doi: 10.1007/s00253-016-7552-2
2. Leclercq A, Moura A, Vales G, Tessaud-Rita N, Aguilhon C, Lecuit M. *Listeria thailandensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019 1;69:74–81. doi: 10.1099/ijsem.0.003097
3. Bertrand S, Ceyskens PJ, Yde M, Dierick K, Boyen F, Vanderpas J, et al. Diversity of *Listeria monocytogenes* strains of clinical and food chain origins in Belgium between 1985 and 2014. *PLoS One* 2016;11:1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0164283
4. Bille, J., Rocourt J, Swaminathan B. *Listeria*, *Erysipelothrix*, and *Kurthia*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of clinical microbiology*. Washington, D.C.: American Society of Microbiology; 1999. p. p346-356.
5. Garrido A, Chapela MJ, Román B, Fajardo P, Vieites JM, Cabado AG. In-house validation of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 2013;164:92–8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.024
6. Le Monnier A, Abachin E, Beretti JL, Berche P, Kayal S. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis by real-time PCR for the *hly* gene. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49:3917–23. doi: 10.1128/JCM.01072-11
7. Seeliger HPR, Höhne K. Chapter II Serotyping of *Listeria monocytogenes* and Related Species. 1979. p. 31–49. doi: 10.1016/S0580-9517(08)70372-6
8. Kérouanton A, Marault M, Petit L, Grout J, Dao TT, Brisabois A. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *J. Microbiol. Methods* 2010;80:134–7. doi: 10.1016/j.mimet.2009.11.008
9. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:3819–22. doi: 10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004
10. ECDC. Proficiency test for *Listeria monocytogenes* whole genome assembly – 2018. Stockholm: 2019.
11. Moura A, Criscuolo A, Pouseele H, Maury MM, Leclercq A, Tarr C, et al. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nat. Microbiol.* 2016;2. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.185
12. ECDC. *Listeriosis*, Annual Epidemiological report for 2017. *Surveill. Rep.* 2020;6.
13. Krawczyk-Balska A, Markiewicz Z. The intrinsic cephalosporin resistome of *Listeria monocytogenes* in the context of stress response, gene regulation, pathogenesis and therapeutics. *J. Appl. Microbiol.* 2016;120:251–65. doi: 10.1111/jam.12989
14. Baquero F, F. Lanza V, Duval M, Coque TM. Ecogenetics of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 2020;113:570–9. doi: 10.1111/mmi.14454
15. van de Beek D, Brouwer MC, Thwaites GE, Tunkel AR. Advances in treatment of bacterial meningitis. *Lancet* 2012;380:1693–702. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61186-6
16. Lorber. *Listeria monocytogenes*. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Infectious Disease Essentials*. 2017. p. 293–5.
17. ECDC, EFSA. Cross-border event – Prolonged multi-country cluster of *Listeria monocytogenes* clonal complex 8, sequence type 8 [CC8.WGS4]. 2018.
18. Van Walle I, Björkman JT, Cormican M, Dallman T, Mossong J, Moura A, et al. Retrospective validation of whole genome sequencing enhanced surveillance of listeriosis in Europe, 2010 to 2015. *Eurosurveillance* 2018;23:1–11. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.33.1700798
19. ECDC, EFSA. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus sequence type 6, infections linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables. 2018.
20. ECDC, EFSA. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 infections linked to consumption of salmon products. 2018. doi: 10.2903/sp.efsa.2019.en-1745
21. ECDC, EFSA. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* clonal complex 8 infections linked to consumption of cold-smoked fish products. 2019. doi: 10.2903/sp.efsa.2019.en-1665
22. Denayer S, Delbrassinne L, Verhaegen B, Botteldoorn N. Annual Report on foodborne outbreaks in Belgium 2017. 2018.

CONTACT

An Van den Bossche, Ph.D • An.vandenBossche@siensano.be • T+32 (0)2 373 31 19
Wesley Mattheus • Wesley.Mattheus@siensano.be • T +32 (0)2 373 32 24



VRAGEN, OPMERKINGEN OF
MEER INFORMATIE :

WWW.SCIENSANO.BE