

NATIONAAL REFERENTIE CENTRUM YERSINIA

Jaarverslag 2020

—

Sciensano
Infectieziekten mens - Bacteriële ziekten
NRC Shigella

Juni 2021 • 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 2018. 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 2020 onderzocht het NRC *Yersinia* 761 unieke *Yersinia* isolaten (waarvan 647 *Y. enterocolitica* en 35 *Y. pseudotuberculosis*). Deze staaantallen zijn opvallend genoeg erg vergelijkbaar met de voorbije 5 jaren, ondanks een verandering van NRC en maatregelen getroffen rond de Sars-CoV-2 pandemie. Van de toegezonden stalen waren 12.4% afkomstig van gehospitaliseerde patiënten.
- Voor *Y. enterocolitica* observeerden we proportioneel meer stammen afkomstig van jonge mannelijke patiënten (MF ratio 1.37), terwijl er globaal geen verschillen waren in de distributie tussen de mannelijke en vrouwelijke bevolking (MF ratio 0.95). Voor *Y. pseudotuberculosis* is er eveneens een onevenwicht (MF ratio 1.91) dat meest uitgesproken is in de groep van +60 jarigen.
- In totaal waren 44.2% (336/761) van de toegezonden *Y.* species humane pathogenen, met als grote meerderheid (269/336, 80%) *Y. enterocolitica* biotype 4/O:3. Onder de niet-pathogene *Yersinia* spp. was de *Y. enterocolitica* biotype 1A het meest prevalent.
- De huidige aanbeveling voor behandeling van Yersinioses zijn ciprofloxacin en levofloxacin (eerstelijns), en doxycycline, TMP-SX, cefotaxime, ceftriaxon, ceftazidime or cefepime (tweedelijns). In 2020 blijven pathogene *Yersinia* spp. zeer gevoelig voor de huidige gebruikte antibiotica. Acht van de 109 geteste *Y. enterocolitica* isolaten vertonen verlaagde gevoeligheid voor ciprofloxacin ($MIC \geq 0.12 \mu g/ml$) en behoorden tot het type *Y. enterocolitica* biotype 4/O:3, net zoals de 6/109 stammen met resistentie voor tetracycline/doxycycline. Alle 18 geteste *Y. pseudotuberculosis* stammen bleken pangevoelig voor de gebruikte antibiotica.
- Het NRC onderzocht de performantie van MALDI-TOF (Biotyper, Bruker) in de identificatie van *Yersinia* species, en in vergelijking met klassieke biochemische identificatie. Uit analyse van >700 stammen bleek dat een significante identificatie (Biotyper score >2.0) van *Y. enterocolitica* en *Y. pseudotuberculosis* via MALDI-TOF in 100% van de gevallen consistent was met de species identificatie via biochemische karakterisatie. Voor de andere *Yersinia* species blijft een verificatie via biochemische karakterisatie noodzakelijk.
- Het NRC voerde WGS uit op twaalf stammen waarbij het species niet kon worden bepaald aan de hand van de biochemische testen en MALDI-TOF. Zeven deze stammen werden geïdentificeerd als *Y. massiliensis/frederiksenii* en behoren allemaal tot dezelfde genetische lijn, die biochemisch licht afwijkt van de klassieke profielen van *Y. frederiksenii* en *Y. massiliensis* door respectievelijk een negatieve Voges-Proskauer en positieve Rhamnose test.
- Voor de overige 5 stammen identificeerde NGS een species dat overeen komt met het dichtst aansluitende biochemische profiel en/of MALDI-TOF identificatie. Deze analyse toont aan dat het genus *Yersinia* zeer divers is, en dat voor een aantal stammen de klassieke biochemische methode of MALDI-TOF geen 100% sluitend resultaat opleveren, maar wel een goede indicatie zijn.

INHOUDSTAFEL

● 1. INLEIDING	6
1.1. Historische prevalentie en trends	6
1.2. Doelstelling	6
1.3. Kwaliteit	6
● 2. METHODOLOGIE	7
2.1 Verzamelen van stammen en metadata	7
2.2 workflow	7
2.3 Antibioticumresistentie	7
● 3. RESULTATEN	9
3.1 Staalcollectie: aantal en specimen	9
3.3. Species, bio-en serotype distributie	10
3.4. Geografische spreiding	10
3.5. Antibioticumresistentie	11
3.6. MALDI-TOF	11
3.7. Whole genome sequencing	12
● 4. RESEARCH & DEVELOPMENT (ENG)	13
4.1 Peer-reviewed publications (2020)	13
4.2 Nieuwe BELAC-geaccrediteerde procedures (2020).	13

1. INLEIDING

1.1. HISTORISCHE PREVALENTIE EN TRENDS

Binnen het genus *Yersinia* zijn er drie species erkend als humane pathogeen: *Y. enterocolitica* (biotypes 1B, 2-5), *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*. Deze laatste maakt geen deel uit van het NRC, maar wordt gediagnosticeerd in de bioterrorisme eenheid van Sciensano.

In 2017 werden binnen de EU 6,240 gevallen van humane *Y. enterocolitica* infecties gediagnoseerd, hetgeen overeenkomt met 2.2 notificaties per 100,000 inwoners. Dit is mogelijk een overschatting van de infectiegraad, gezien op Europees niveau geen onderscheid gemaakt wordt tussen pathogene en niet-pathogene stammen (biotype 1A). In België werd een scherpe daling van het aantal bevestigde *Yersinia* infecties vastgesteld in de jaren 90 (Figuur 2).

Volgens de laatste gepubliceerde data van het toenmalige NRC (2014), werd het overgrote deel van de yersiniosen in België veroorzaakt door *Y. enterocolitica* bioserotype 4/O:3, en in mindere mate door 2/O:9 en 2/O:5,27. De relatieve proportie van de serotypen varieert volgens leeftijd, gezien serotype O:3 het meest prevalent is bij jonge en bij mannelijke patiënten. Serotype O:9 wordt gewoontelijk vaker aangetroffen bij invasieve yersiniosen, waarbij de pathogeen wordt geïsoleerd uit bloed- en extraintestinale stalen (Verhaegen et al, 1998).

Y. pseudotuberculosis is minder prevalent, maar veroorzaakt meer invasieve infecties in vergelijking met *Y. enterocolitica*. In België fluctueert de incidentie van infecties met *Y. pseudotuberculosis* tussen de 0.08 en 0.36/100.000 inwoners. Hoewel er meer dan 20 serotypen bestaan, worden 90% van de humane (en ook dierlijke) infecties met *Y. pseudotuberculosis* veroorzaakt door serotype O:1.

Is er momenteel geen wettelijke verplichting om infecties met *Yersinia* te melden aan de overheid, uitgezonderd voor voedselgerelateerde uitbraken. Desalniettemin organiseert het FAVV sinds 1997 een monitoring van pathogene *Y. enterocolitica* bij varkers, en dit in het kader van EU Directive 2003/99/EC.

1.2 DOELSTELLING

De belangrijkste opdrachten van het Nationaal Referentiecentrum (NRC) voor *Yersinia enterocolitica* en *Y. pseudotuberculosis* zijn (i) het **onderscheiden van pathogene van niet-pathogene infecties** van *Y. enterocolitica*, en (ii) het verzekeren van een **epidemiologisch toezicht** op humane infecties van *Yersinia spp.* 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 twee kiemen te evalueren. Specifieke gevallen zoals multidrugresistente of invasieve stammen worden onderzocht door Whole-Genome Sequencing (WGS). Het NRC houdt eveneens toezicht op de antibioticagevoeligheid van de geïsoleerde kiemen.

Wanneer er een epidemie vermoed wordt, waarschuwt het NRC de gezondheidsinspecteurs van de betrokken regio (AVIQ, Agentschap Zorg & Gezondheid of CoCom) die vervolgens het nodige doet om een onderzoek in te stellen bij de patiënten. Dit toezicht laat toe epidemieën te controleren, preventiemaatregelen uit te stippelen en de genomen maatregelen ten gunste van de volksgezondheid en voor de bescherming van de consument te evalueren. Indien nodig, contacteren de gezondheidsinspecteurs vervolgens het Federale Agentschap voor Veiligheid van de Voedingsketen (FAVV) voor verder onderzoek naar de mogelijke bron van besmetting.

Maandelijks worden 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://nrchm.wiv-isp.be/nl/default.aspx>.

1.3. KWALITEIT

Sinds 2020 werd het NRC ondergebracht in de dienst humane bacteriële ziekten van Sciensano, samen met het NRC Salmonella en Shigella. Sinds meer dan 40 jaar streeft dit laboratorium 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.

Zoals weergegeven in sectie 4.2, werd in 2020 de kwaliteitsstandaard ISO/IEC 15189 verkregen voor de uitgevoerde analyses die in dit rapport worden beschreven. 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.

2. METHODOLOGIE

2.1 VERZAMELEN VAN STAMMEN EN METADATA

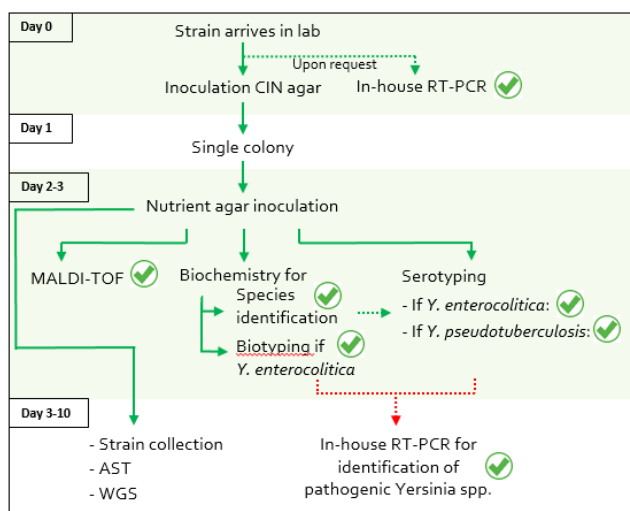
Isolaten van *Yersinia* worden door klinische laboratoria op vrijwillige basis opgestuurd naar het NRC, samen met het formulier met inlichtingen over de stam en de epidemiologie.

De gevraagde metadata bevatten de leeftijd, geslacht en postcode van de patiënt, het specimen waaruit de stam werd opgezuiverd, het geassocieerde ziektebeeld, informatie omtrent een mogelijke gestarte antibioticum behandeling en de evolutie van de ziekte en informatie i.v.m. recente reizen en hospitalisatie van de patiënt. Indien er al vastgestelde antigeenkenmerken zijn, worden deze ook gevraagd.

Na ontvangst krijgt elk staal een uniek nummer in de vorm S20BD0000x, en wordt de opgenomen metadata digitaal ingebracht in het STARLIMS systeem. Het staal wordt na analyse bewaard in 20% glycerol op -80°C.

2.2 WORKFLOW

De workflow van het NRC wordt schematisch weergegeven in Figuur 1.



Figuur 1. Workflow in het NRC Yersinia, 2020. Testresultaten met een vinkje worden gecommuniceerd naar het indienende labo. AST, antibioticum susceptibiliteitstest; WGS, whole-genome sequencing.

Op aanvraag van het laboratorium kan op het (primaire) staal een RT-PCR worden uitgevoerd ter bepaling van de pathogeniciteit van de stam. Deze PCR richt zich op de identificatie van het chromosomale virulentiegen *ail*, *yopM* (YE/YP), *inV* (specifiek voor YP and *Y. pestis*) and *yihN* (specifiek voor *Y. pestis*). Niet-pathogene *Yersinia* spp. zijn negatief voor alle probes.

¹ Jolley KA, et al. Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology* (Reading). 2012 Apr;158(Pt 4):1005-1015.

Alle stammen worden in cultuur gebracht op CIN agar (Oxoid) op 30°C. Hierop volgt species confirmatie met MALDI-TOF (Biotyper, Bruker) en in parallel biochemische testen met de volgende suikers: ornithine, pyrazinamidase, rhamnose, sucrose, Voges-Proskauer, Ureum, Simmons citrate, Raffinose, Melibiose, Sorbose en Indole. Bij identificatie van *Y. enterocolitica* wordt deze gebiotypeerd volgens het conventionele schema van Wauters (Tabel 1). Het serotype van de stam van de belangrijkste serogroepen wordt vervolgens onderzocht voor *Y. enterocolitica* en *Y. pseudotuberculosis* via klassieke slide agglutinatie met behulp van commerciële antilichamen (Sifin and Staten Serum Institute, Elitech).

Tabel 1. Wauters' schema for Biotyping of *Y. enterocolitica* () *vertraagde reactie*

Biotype	1A	1B	2	3	4	5
Tween Esterase	+	+	-	-	-	-
Esculine	+/-	-	-	-	-	-
Salicine	+/-	-	-	-	-	-
Indole	+	+	(+)	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	-	+/-
Trehalose	+	+	+	+	+	-
Pyrazinamidase	+	-	-	-	-	-

In geval van onduidelijke resultaten, wordt de stam verder onderzocht met behulp van Next-Generation Sequencing (NGS). In dit geval wordt Genomisch DNA geëxtraheerd met de MgC Bacterial DNA Kit™ met 60 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. Species identificatie wordt uitgevoerd op basis van Ribosomale (rMLST) en genomische (cgMLST) Multilocus Sequence Typing.

2.3 ANTIBIOTICUMRESISTENTIE

Aan het NRC wordt de antibioticagevoeligheid van *Yersinia* spp. bepaald door broth microdilutie (Sensititre™, Thermo Fisher), waarbij de Minimale Inhibitorische Concentratie (MIC) waarde voor elk antibioticum wordt bepaald en wordt geïnterpreteerd met de aanbevelingen van EUCAST (Tabel 1). Omwille van pragmatische redenen wordt hetzelfde panel van antibiotica gebruikt voor *Salmonella*, *Shigella* en *Yersinia* spp, gezien de huidige SOP 12/SA/24/E geaccrediteerd is (ISO 15189) voor alle *Enterobacteriaceae*. Tetracycline wordt gebruikt voor het voorspellen van gevoeligheid voor doxycycline, met MIC ≤4 mg/L voor wild-type isolaten. Voor azithromycine gebruiken we de ECOFF waarde van MIC≤8 µg/ml voor wild-type isolaten.

Omwille van budgetaire limitaties wordt slechts een selectie van pathogene *Yersinia* spp. getest.

² Savin C, et al. Genus-wide *Yersinia* core-genome multilocus sequence typing for species identification and strain characterization. *Microb Genom*. 2019 Oct;5(10):e000301.

Tabel 1. Antibiotica getest via broth microdilutie

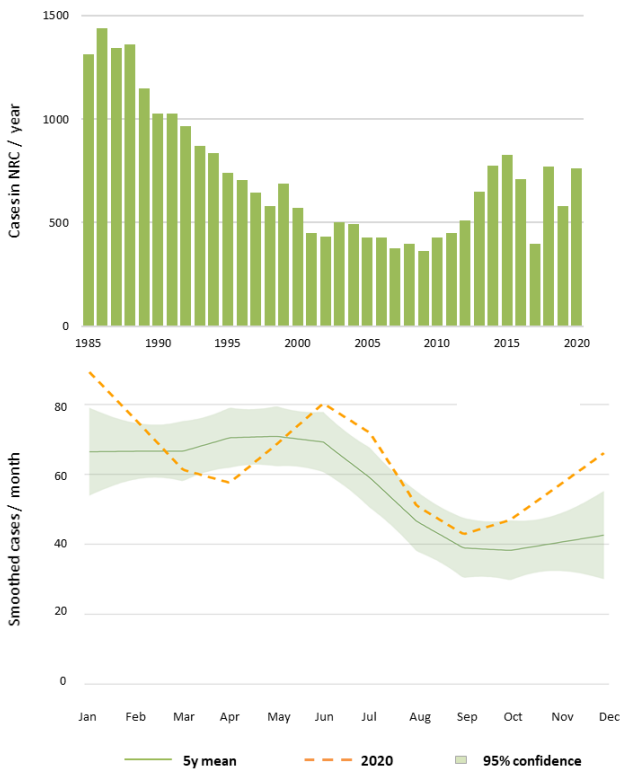
Antibioticum	CODE	Geteste conc. (mg/L)	Gevoeligheids-breekpunt (mg/L)
<i>AMPICILLINE</i>	AMP	1-64	8.0
<i>AZYTHROMYCINE</i>	AZI	2-64	ND
<i>CEFOTAXIME</i>	FOT	0.25-4	1.0
<i>CEFTAZIDIME</i>	TAZ	0.5-8	1.0
<i>CHLORAMPHENICOL</i>	CHL	8-64	8.0
<i>CIPROFLOXACINE</i>	CIP	0.015-8	0.25
<i>COLISTINE</i>	COL	0.5-8	2.0
<i>ERTAPENEM</i>	ETP	0.015-2	0.5
<i>GENTAMICINE</i>	GEN	0.5-16	2.0
<i>MEROPENEM</i>	MER	0.03-16	2.0
<i>SULFAMETHOXAZOLE</i>	SMX	32-1024	256
<i>TETRACYCLINE</i>	TET	2-64	4.0
<i>TIGECYCLINE</i>	TGC	0.25-8	ND
<i>TRIMETHOPRIM</i>	TMP	0.5-16	4.0

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

3. RESULTATEN

3.1 STAALCOLLECTIE: AANTAL EN SPECIMEN

In 2020 typeerde het NRC 761 unieke *Yersinia* isolaten (waarvan 647 *Y. enterocolitica* en 35 *Y. pseudotuberculosis* isolaten) in opdracht van 92 klinische laboratoria. Deze stalaantallen zijn opvallend genoeg erg vergelijkbaar met de voorbije 5 jaren, ondanks een verandering van NRC en maatregelen getroffen rond de Sars-CoV-2 pandemie. Zoals weergegeven in Figuur 2, werd aan de start van de eerste lockdown (april 2020) slechts een kleine daling van stalen vastgesteld, en in het najaar werden zelfs meer stammen ontvangen dan de voorbije jaren.



onderzocht aan het NRC, weergegeven per jaar voor de periode 1985-2020. **Onder:** Overzicht van de maandelijks gerapporteerde yersiniosen in 2020, in vergelijking met de 5 voorbije jaren. **Figuur 2. Boven:** Totaal aantal bevestigde *Yersinia* spp.

Van de toegezonden stalen waren 12.4% afkomstig van gehospitaliseerde patiënten. Het merendeel van de *Yersinia* stammen (92.6%) werd geïsoleerd uit faeces, terwĳ 0.5% uit bloedculturen afkomstig waren: 3 *Y. pseudotuberculosis* stammen, en 1 *Y. enterocolitica* bioserotype 4/O:3. In 3 van deze gevallen (0.4%) werd sepsis aangegeven op het aanvraagformulier. Een overzicht van de oorsprong van de stammen wordt weergegeven in Tabel 3.

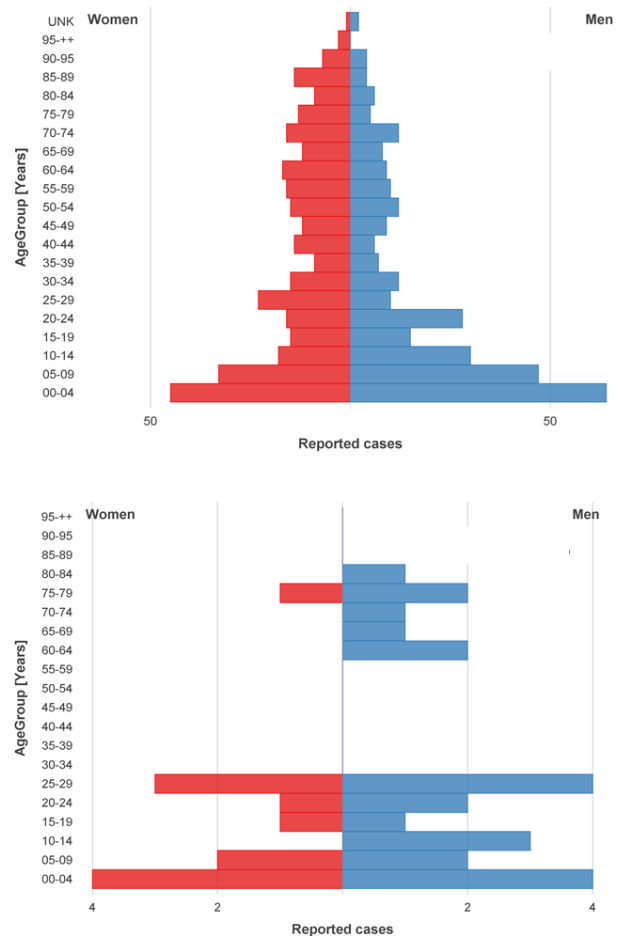
Tabel 2. Oorsprong van de isolaten.

Specimen	N	%
FAECES	705	92.6
BLOED	4	0.5
URINE	1	0.1
ANDERE/ONBEKEND	51	6.7

In totaal werd in 12 stalen geen *Yersinia* spp. aangetroffen. In 5/12 gevallen betrof dit een isolaat van *Citrobacter* spp.

3.2 LEEFTIJD- EN GENDERDISTRIBUTIE

De grootste proportie van ontvangen *Yersinia* stalen werd geïsoleerd bij kinderen jonger dan 5 jaar, en de groep van min-15 jarigen vertegenwoordigt 35.5% van het totale aantal stammen (Figuur 3).



Figuur 3. Leeftijdspiramide gegenereerd voor *Y. enterocolitica* (boven) en pseudotuberculose (onder), periode 2020.

Voor *Y. enterocolitica* observeerden we proportioneel meer stammen afkomstig van jonge mannelijke patiënten (MF ratio 1.37), terwijl er globaal geen verschillen waren in de distributie tussen de mannelijke en vrouwelijke bevolking (MF ratio 0.95). Voor *Y. pseudotuberculosis* is er eveneens een onevenwicht (MF ratio 1.91), met een meest uitgesproken in de groep van +60 jarigen.

Voor 25 stammen (3.3%) was er geen informatie over het geslacht van de patiënt.

3.3. SPECIES, BIO-EN SEROTYPE DISTRIBUTIE

Een overzicht van de geïdentificeerde species, biotypen en serovars is weergegeven in tabellen 3 en 4. In totaal waren 44.2% (336/761) van de toegezonden *Y. species* humane pathogenen, met als grote meerderheid (269/336) *Y. enterocolitica* biotype 4/O:3. Onder de niet-pathogene *Yersinia* spp. was de *Y. enterocolitica* biotype 1A het meest prevalent. Van 19/761 stammen kon op basis van biochemische testen geen species worden bepaald; Deze isolaten werden verder onderzocht via NGS (sectie 3.7).

Tabel 3. Overzicht van de verschillende geïdentificeerde pathogene *Yersinia* spp., 2020.

Pathogeen	Biotype	Serotype	N	%
<i>Y. Enterocolitica</i>	4	O:3	269	35.3
		NT	3	0.4
	2	O:9	8	1.1
		O:8	4	0.5
		O:5,27	1	0.1
		NT	6	0.8
	5	O:3	4	0.5
		3	O:3	2
	1B	NT	1	0.1
		NT	2	0.3
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	1	8	1.1	
	UNK	27	3.5	

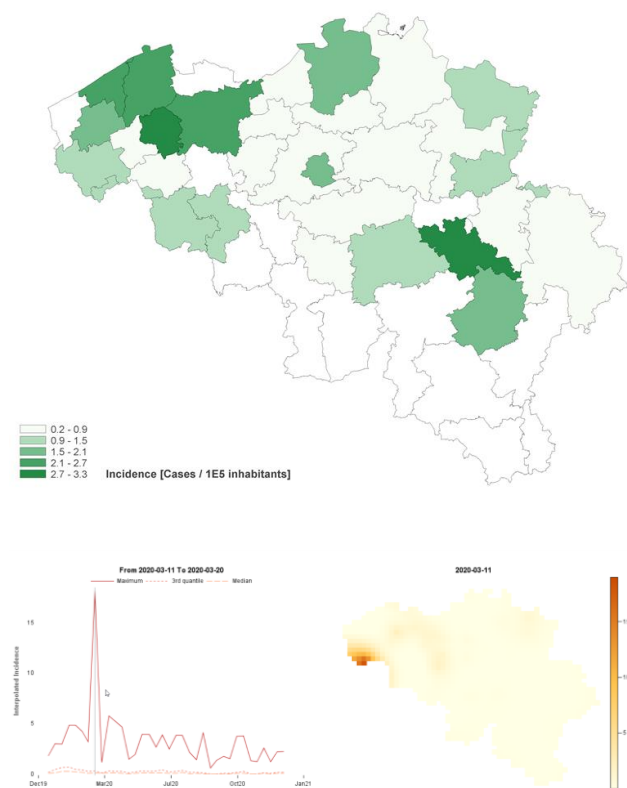
Tabel 4. Overzicht van de verschillende geïdentificeerde niet-pathogene *Yersinia* spp., 2020.

Pathogeen	Biotype	Serotype	N	%
<i>Y. Enterocolitica</i>	1A	NT	214	28.1
		O:8	85	11.2
		O:5,27	45	5.9
		O:9	2	0.3
<i>Y. frederiksenii</i>			17	2.3
<i>Y. intermedia</i>			11	1.4
<i>Y. bercovieri</i>			11	1.2
<i>Y. mollaretii</i>			5	0.7
<i>Y. massiliensis</i>			3	0.4
<i>Y. rohdei</i>			2	0.3
<i>Y. kristensenii/Y. aleksiciae</i>			10	1.2
<i>Y. ruckeri</i>			1	0.1
<i>Y. species</i>			19	2.5

3.4. GEOGRAFISCHE SPREIDING

Een overzicht van de geografische spreiding van de humane yersiniosen is weergegeven in Figuur 4. In 2020 was de meerderheid van de stammen (68.3%) afkomstig uit Vlaanderen; Waalse en Brusselse patiënten zorgden voor 18.5% en 7.1% van de stammen, respectievelijk. Voor 46 stammen (6.0%) was er geen informatie over de afkomst.

Op niveau van de individuele arrondissementen (Figuur 4, boven), werden de hoogste incidenties gemeten in Tielt (21.7 gevallen/10⁵ bewoners) en Ieper (15.1 gevallen/10⁵). Een opvallende piek in ontvangen stalen uit West-Vlaanderen in maart 2020 (Figuur 4, onder) werd niet aan een uitbraak gelinkt, aangezien dit verschillende bio-en serotypen van *Y. enterocolitica* omvatte.



Figuur 6. Boven. Incidentie van het aantal ontvangen *Yersinia* stalen per arrondissement. Weergegeven per 100.000 inwoners. Onder. Tijdsduur van het aantal ontvangen *Yersinia* stalen, met een raam van 10 dagen. De piek in staalaantallen uit Zuid-west Vlaanderen werd bereikt in maart 2020, maar dit betrof geen uitbraak van Yersiniosis.

Slechts drie (niet-gehospitaliseerde) patiënten rapporteerden een recente reis naar het buitenland; in deze drie gevallen ging het bovendien om stammen behorend tot (het niet-pathogene) *Y. enterocolitica* biotype 1A.

3.5. ANTIBIOTICUMRESISTENTIE

De huidige aanbeveling voor behandeling van Yersinioses zijn ciprofloxacine en levofloxacine (eerstelijns), en doxycycline, TMP-SX, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime of cefepime (tw eedelijns).

Hoewel de antibioticagevoeligheid verschilt tussen de verschillende serogroepen, is *Y. enterocolitica* gewoontlijk gevoelig voor aminoglycosiden, cotrimoxazole, chloramphenicol, tetracycline, 3^{de} generatie cephalosporins en fluoroquinolones. Resistentie tegen vroegere generaties β -lactams is gerelateerd aan differentiële expressie van twee natuurlijk gecodeerde genen *blaA* (Class A β -lactamase, constitutief tot expressie gebracht), en *blaB* AmpC-type β -lactamase, induceerbaar), hetgeen het niveau en spectrum van β -lactam resistentie bepaalt³. Ook *Y. pseudotuberculosis* stammen zijn voorlopig pan-gevoelig voor de huidig gebruikte antibiotica, hoewel het species intrinsiek resistent is voor polymixin B/ colistin.

In 2020 werd het resistentieprofiel bepaald voor een selectie van pathogene *Y. enterocolitica* (n=109) en *Y. pseudotuberculosis* (n=18) stammen, en de resultaten worden weergegeven in tabel 5.

Tabel 5. Globale niet-gevoeligheid (%) van pathogene *Y. enterocolitica* (YERSENT) en *Y. pseudotuberculosis* (YERSPS) stammen in België. Voor azithromycine en tigecycline bestaan geen klinische breekpunten.

Class	Antibiotic	YERSENT*	YERSPS
B-lactams	AMPICILLINE	100	0.0
	CEFOTAXIME	0.0	0.0
	CEFTAZIDIME	0.0	0.0
	MEROPENEM	0.0	0.0
	ERTAPENEM	0.0	0.0
Protein synthesis inhibitors	CHLORAMPHENICOL	0.0	0.0
	GENTAMICINE	0.0	0.0
	TETRACYCLINE	6.4	0.0
	TIGECYCLINE	ND	ND
Gyrase inhibitors	AZITHROMYCINE	0.0	0.0
	CIPROFLOXACINE	0.9	0.0
Cell wall inhibitor	COLISTINE	0.0	100
Folate Synthesis	SULFAMETHOXAZOLE	18.3	0.0
	TRIMETHOPRIM	2.8	0.0

* Om de Belgische prevalentie van de verschillende biotypes te weerspiegelen, selecteerden we stammen van Biotype 4/O:3 (n=103), 2/O:9 (n=5) en 2/O5,27 (n=1).

In 2020 blijven pathogene *Yersinia* spp. zeer gevoelig voor de huidige gebruikte antibiotica. De acht isolaten met verlaagde gevoeligheid voor ciprofloxacine (MIC \geq 0.12 μ g/ml) behoorden tot het type *Y. enterocolitica* biotype 4/O:3, net

³ Bent ZW, Young GM. Contribution of BlaA and BlaB beta-lactamases to antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica* biovar 1B. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54:4000-2.

zoals de zes stammen met resistentie voor tetracycline/doxycycline.

3.6. MALDI-TOF

Aangezien in 2020 het NRC voor het eerste werd opgestart in Sciensano, werd besloten om de species identificatie uit te voeren via twee methoden: (1) de klassieke methode via biochemische karakterisatie, en (2) MALDI-TOF analyses.

De resultaten van de vergelijking van beide technieken worden weergegeven in tabel 6. Hierbij wordt er steeds vanuit gegaan dat biochemische karakterisatie de gouden standaard is, wanneer er een inconsistentie is bij de identificatie via beide methoden.

Tabel 6. Vergelijking resultaten species identificatie via (1) Biochemische karakterisatie en (2) MALDI-TOF.

ID Biochemie	ID MALDI-TOF:		
	= ID	No ID	Other ID
<i>Y. bercovieri</i>	7	4	
<i>Y. enterocolitica</i>	643	3	1
<i>Y. frederiksenii</i>	17		
<i>Y. intermedia</i>	7	1	3
<i>Y. kristensenii/aleksiciae*</i>	9	1	
<i>Y. massiliensis</i>	1	2	
<i>Y. mollaretii</i>	0	5	
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	35		
<i>Y. rohdei</i>	1		1
<i>Y. ruckeri</i>	1		
<i>Y. species</i>	16		3
Totaal	737	16	8
	96.8%	2.1%	1.1%

* *Y. kristensenii* en *Y. aleksiciae* zijn biochemisch niet te onderscheiden

Voor 96.8% van de 761 toegestuurde stammen was de identificatie via beide methoden identiek. Hierbij kon voor 16 stammen geen identificatie op species niveau bepaald worden via beide technieken. Deze werden verder onderzocht via NGS (zie 3.7).

16 (2.1%) *Yersinia* stammen gaven geen significant ID via MALDI-TOF, hoewel via biochemische testen een ID kon bepaald worden. Hierbij gaat het voornamelijk om stammen waarbij een mix aan significante IDs wordt teruggevonden tijdens MALDI-TOF analyse.

Slechts voor 1.1% van de stammen was er geen consistentie met het biochemisch bepaalde ID. In 3 gevallen, was er geen identificatie mogelijk via biochemische tests maar wel via MALDI-TOF. Voor 5 stammen werd het ID bepaald door MALDI-TOF als foutief beschouwd. In 4 gevallen werd de stam via MALDI-TOF geïdentificeerd als *Y. frederiksenii*, terwijl biochemie aangaf dat het ging om *Y. enterocolitica* (1) en *Y. intermedia* (3). Één stam werd

geïdentificeerd als *Y. bercovieri*, hoewel het om *Y. rodheii* ging.

Uit deze data besluit het NRC dat een significante identificatie (Biotyper score >2.0) van *Y. enterocolitica* en *Y. pseudotuberculosis* via MALDI-TOF in 100% van de gevallen consistent was met de species identificatie via biochemische karakterisatie. Voor de andere *Yersinia* species blijft een verificatie via biochemische karakterisatie noodzakelijk.

3.7. WHOLE GENOME SEQUENCING

Twaalf stammen waarbij het species niet kon worden bepaald aan de hand van de biochemische testen werden verder onderzocht met behulp van NGS. De bepaling van het species werd uitgevoerd op basis van 2 methoden: enerzijds via de sequenties van 53 genen die coderen voor de ribosomale subunits (rMLST) en anderzijds via de sequenties van 500 genen verspreid over het genoom (cgMLST). Voor alle geanalyseerde stammen werd aan de hand van beide methoden hetzelfde resultaat bekomen. De resultaten worden weergegeven in Tabel 7

Tabel 7. Species identificatie via Next generation sequencing.

Species ID via NGS	N
<i>Y. massiliensis/frederiksenii</i>	7
<i>Y. aleksicia</i>	2
<i>Y. rodheii</i>	2
<i>Y. mollaretii</i>	1

De 7 stammen die via NGS werden geïdentificeerd als *Y. massiliensis/frederiksenii* behoren allemaal tot dezelfde genetische lineage. Deze lineage wordt in de literatuur beschreven als genetisch meer verwant met de andere *Y. massiliensis* lineages dan met de andere *Y. frederiksenii* lineages en daarom ook beschouwd als *Y. massiliensis*. Biochemisch wijken deze stammen af van het profiel verwacht voor *Y. frederiksenii* en *Y. massiliensis* door respectievelijk een negatieve Voges-Proskauer en positieve Rhamnose test.

Voor de overige 5 stammen werd aan de hand van de genetische analyse steeds een species bepaald dat overeen komt met het dichtstaansluitende biochemische profiel of MALDI-TOF identificatie. Deze analyse toont aan dat het genus *Yersinia* zeer divers is en dat voor een aantal stammen de klassieke biochemische methode of MALDI-TOF geen 100% sluitend resultaat opleveren, maar wel een goede indicatie zijn.

4. Research & Development (ENG)

-

4.1 PEER-REVIEWED PUBLICATIONS (2020)

No publications in 2020.

4.2 NIEUWE BELAC-GEACCREDITEERDE PROCEDURES (2020).

1. SOP 12/YE/02/E Species identification and biotyping Yersinia
2. SOP 12/YE/03/E Yersinia enterocolitica serotyping
3. SOP 12/YE/04/E Yersinia pseudotuberculosis serotyping

CONTACT

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

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 •