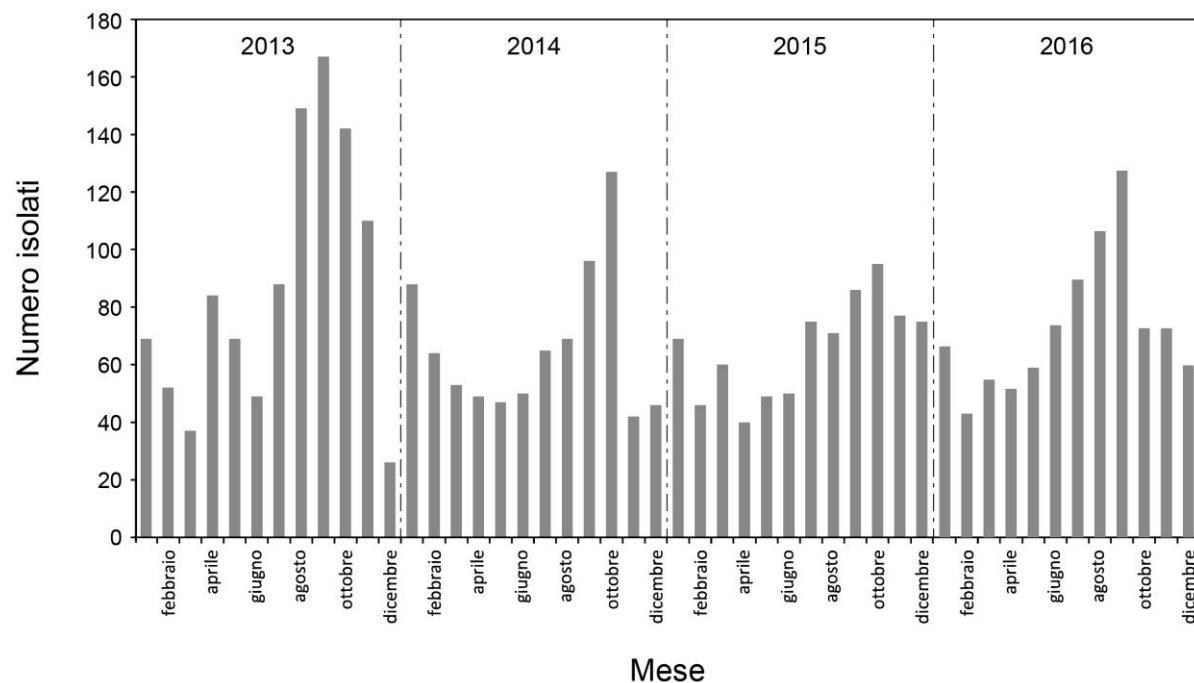




REPORT DELLA ATTIVITA' DEL CENTRO ENTERNET SU *Salmonella enterica* DELL'ANNO 2016

Aprile 2017

Fig. 1: Isolati per mese di prelievo nel periodo 2013- 2016



Periodo Gennaio-Dicembre 2016

Il report si riferisce ai 877 stipti di *Salmonella enterica* isolati dai pazienti della Regione Emilia-Romagna nel periodo gennaio-dicembre 2016 e inviati al Centro di Riferimento Regionale Enternet.

Fig. 2: Percentuale di isolati attribuibili ai 10 principali sierotipi di *Salmonella enterica*, sulla base degli isolamenti 2016, negli anni 2014 (grigio chiaro), 2015 (grigio scuro) e 2016 (nero)

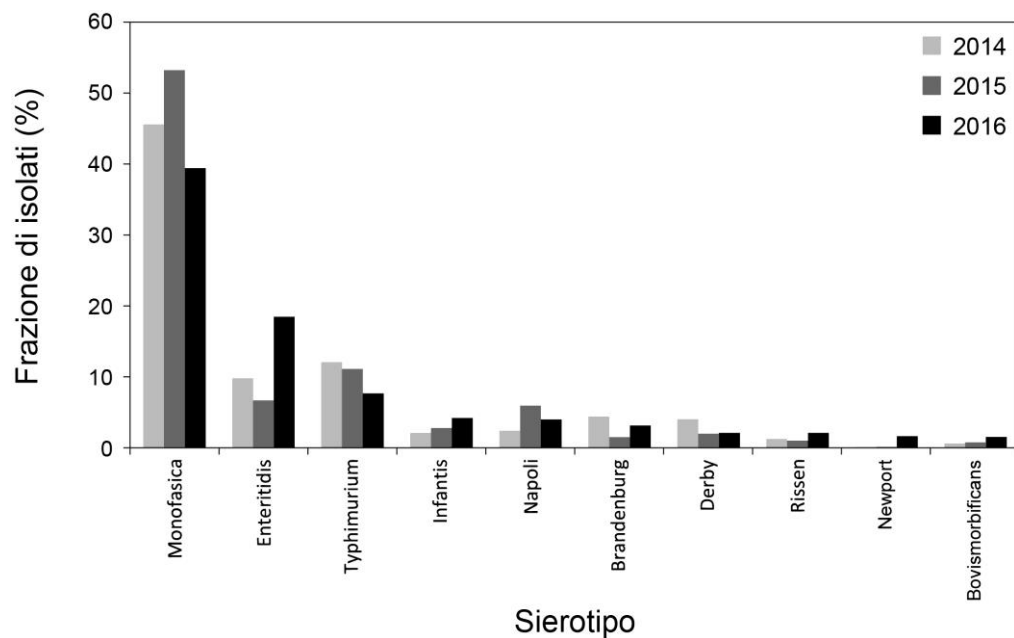
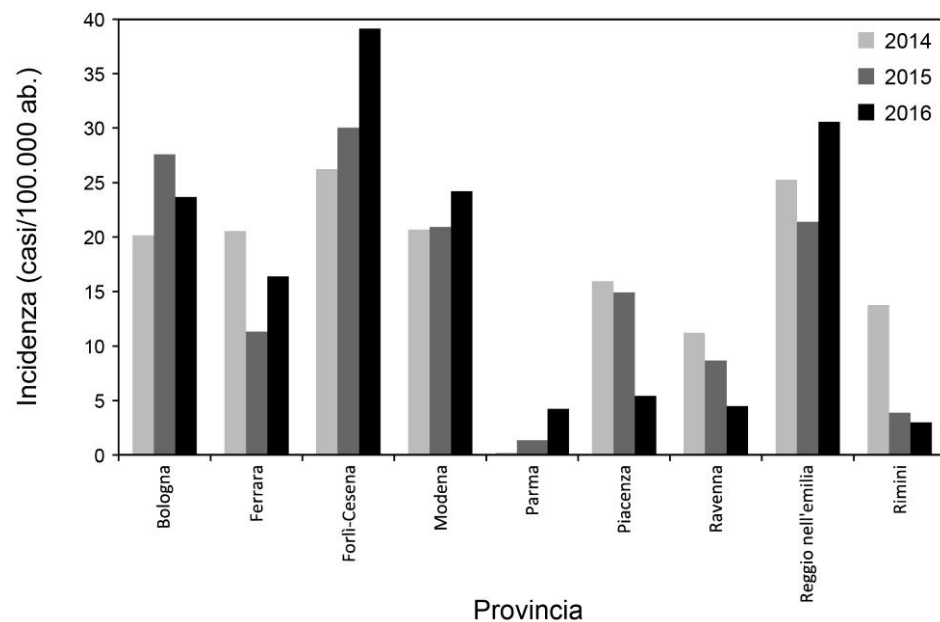


Fig. 3: Isolamento di *Salmonella enterica* per 100.000 abitanti negli anni 2014 (grigio chiaro), 2015 (grigio scuro) e 2016 (nero) in funzione della provincia di prelievo.



Descrizione del sistema di allerta per la segnalazione di focolai di *Salmonella enterica*

Al Centro di Riferimento Regionale Enteric Emilia-Romagna arrivano ceppi di *Salmonella enterica* isolati da 10 Laboratori Clinici Microbiologici della Regione. I ceppi pervenuti sono tipizzati sierologicamente e genotipizzati attraverso diverse tecniche che ne permettono una più fine caratterizzazione utilizzabile a fini epidemiologici.

A tal fine presso il Centro è in funzione un sistema di allerta per l'individuazione di focolai di *Salmonella enterica*. Tale sistema è stato realizzato allo scopo di poter individuare focolai diffusi (cioè focolai che si protraggono nel tempo e che possono coinvolgere un ampio territorio, come diverse province) che per la loro natura sono più difficili da riconoscere a livello di singola azienda sanitaria locale.

L'analisi di trend e le procedure per l'individuazione precoce dei potenziali focolai di salmonellosi sono state effettuate con l'ausilio di appositi modelli matematici sulla base della differenziazione genotipica fornita dalla PFGE. Alla luce dei dati di serie storiche in Emilia Romagna è stato possibile verificare in via preliminare che i casi di salmonellosi associati a singoli genotipi PFGE in regione hanno carattere sporadico. Di conseguenza si è scelto di utilizzare per le analisi di trend modelli semiparametrici che, a differenza dei modelli parametrici, non si basano su assunzioni di 'normalità' del campione. In particolare, il modello semiparametrico che abbiamo utilizzato assume che i casi osservati appartengano a una distribuzione discreta di Poisson (si veda Frisén et al. 2009 per maggiori dettagli sul modello). Per individuare situazioni anomale che possono essere associate a un focolaio, il modello assume che i casi osservati possano, in una data finestra temporale, avere alternativamente media costante (ipotesi nulla) o crescere monotonicamente (ipotesi alternativa).

Lo stimatore di questo processo viene calcolato come il rapporto tra gli stimatori di massima verosimiglianza dell'ipotesi alternativa e dell'ipotesi nulla. L'allerta viene dichiarata quando lo stimatore supera un pre-determinato valore di soglia, che coincide con l'affermare con una sufficiente confidenza che, in una data finestra temporale, i casi isolati seguono verosimilmente un andamento crescente (invece che costante). L'analisi è stata effettuata attraverso il software statistico R 2.15.3 (The R Foundation for Statistical Computing 2010) e il package 'surveillance' (Höhle et al. 2015).

Il sistema di allerta sopra descritto è in funzione dalla primavera del 2013 e, nell'anno 2016, ha segnalato 7 potenziali focolai di *Salmonella enterica* in regione Emilia-Romagna. Di questi 7, tre potenziali focolai, che sono risultati perdurare per diverse settimane, sono stati segnalati alle aziende sanitarie, mentre per i rimanenti quattro, che hanno coinvolto un numero limitato di isolati e che si sono estinti in breve tempo, non si è ritenuto di procedere con ulteriori approfondimenti epidemiologici. Gli approfondimenti epidemiologici hanno confermato il focolaio identificando l'alimento responsabile in due dei tre eventi indagati. In uno dei due casi identificati, l'alimento responsabile della contaminazione è risultato essere salame di carne suina. Nel secondo caso identificato, gli alimenti responsabili della contaminazione sono risultati essere prodotti a base di uova.

Potenziali focolai diffusi rilevati nell'anno 2016

Attraverso l'analisi sistematica dei tracciati PFGE degli isolati di *Salmonella enterica* di origine umana effettuata presso il Centro Regionale Enteret e con l'ausilio del sistema di allerta per l'individuazione precoce di focolai sono stati evidenziati, nell'anno 2016, tre potenziali focolai relativi a isolati sierotipizzati e genotipizzati in tempo utile per procedere ad allerte sanitarie.

1) Nel periodo maggio-luglio 2016 è stato rilevato un potenziale focolaio epidemico diffuso nelle province di Reggio Emilia e Modena che ha interessato 19 casi di tossinfezione con isolamento di *Salmonella enterica* Typhimurium 4,[5],12:i,- (variante monofasica) con genotipo STYMXB_PR.0873 (si veda Fig. 4). L'indagine epidemiologica ha permesso individuare la fonte d'infezione in salami di suino dai quali è stata isolata *Salmonella enterica* Typhimurium 4,[5],12:i,- avente lo stesso genotipo PFGE dei casi umani.

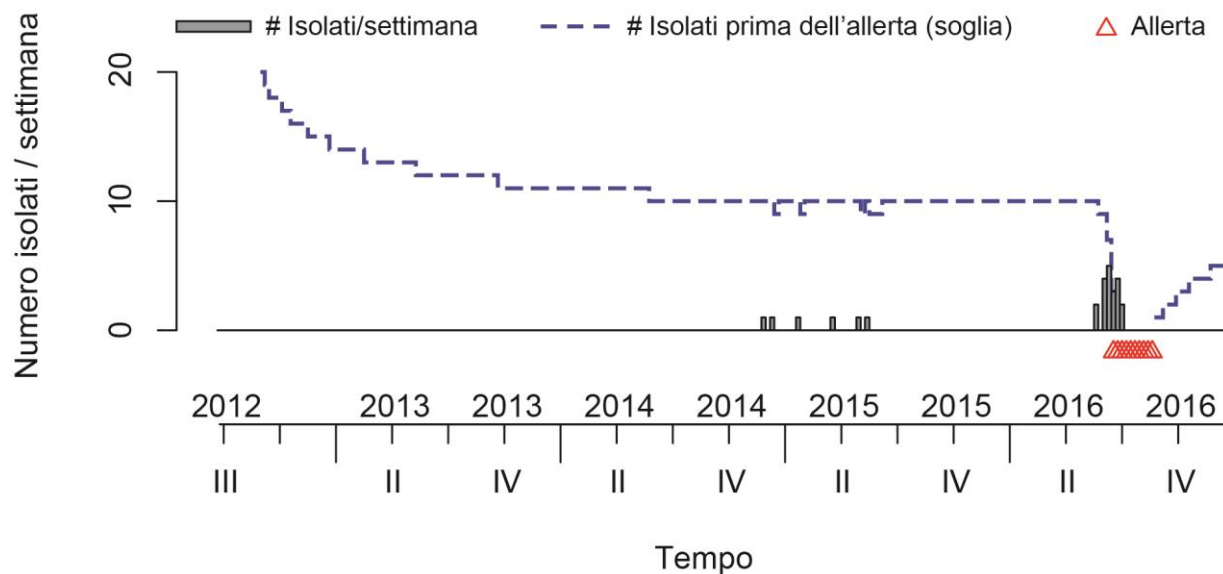


Fig. 4: Andamento nel tempo del numero di isolati settimanali di *Salmonella enterica* Typhimurium 4,[5],12:i,- (variante monofasica) con genotipo STYMXB_PR.0873 in Regione Emilia Romagna (barre grigie). La linea tratteggiata blu indica il numero minimo di casi settimanali previsto dal modello matematico sopra il quale scatta l'allerta epidemica. I triangoli rossi indicano la presenza di un potenziale focolaio diffuso.

2) Nel periodo settembre 2016 è stato rilevato un potenziale focolaio epidemico diffuso nelle province di Modena e Reggio Emilia che ha interessato 17 casi di tossinfezione da *Salmonella enterica* Enteritidis con genotipo SXB_PR.0112 (si veda Fig. 5). L'indagine epidemiologica ha permesso individuare la fonte d'infezione in prodotti a base di uova nei quali è stata isolata *Salmonella enterica* Enteritidis avente lo stesso genotipo PFGE dei casi umani.

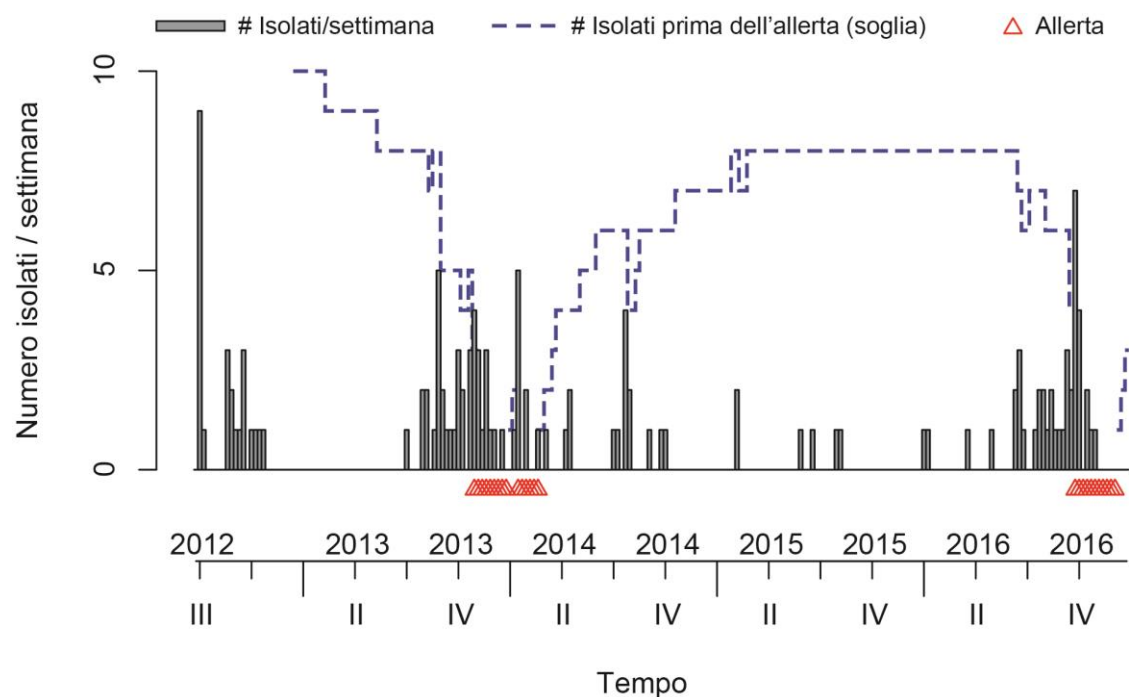
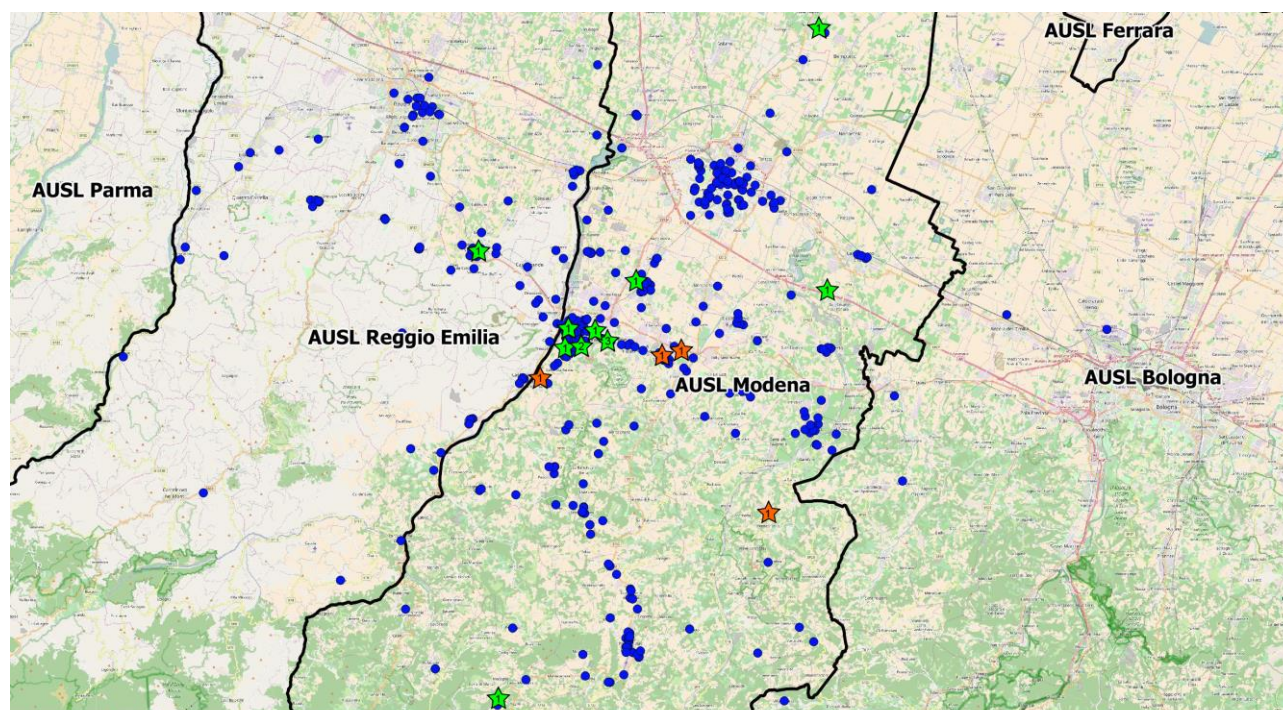


Fig. 5: Andamento nel tempo del numero di isolati settimanali di *Salmonella enterica* Enteritidis con genotipo SXB_PR.0112 in regione Emilia-Romagna (barre grigie). La linea tratteggiata blu indica il numero minimo di casi settimanali previsto dal modello matematico sopra il quale scatta l'allerta epidemica. I triangoli rossi indicano la presenza di un potenziale focolaio diffuso.

Ulteriori approfondimenti epidemiologici effettuati nell'allevamento di galline ovaiole dal quale provenivano le uova contaminate, hanno permesso di isolare *Salmonella enterica* Enteritidis avente lo stesso genotipo PFGE degli alimenti contaminati e dei casi umani. Approfondimenti microbiologici effettuati con un secondo metodo di genotipizzazione, Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA), sugli isolati provenienti dagli alimenti contaminati e dagli isolati di allevamento (18 stipti totali), hanno permesso di associare tutti questi isolati a un singolo genotipo MLVA, denominato con la stringa 5-6-10-7. Utilizzando i risultati di entrambi i metodi di tipizzazione (PFGE e MLVA) è stato possibile discriminare con un maggior grado di dettaglio quali tra i casi umani inizialmente attribuiti al focolaio potevano essere attribuiti a fonti alimentari provenienti dall'allevamento individuato. In particolare, 13 casi umani sono stati

confermati appartenere al focolaio, mentre quattro presentavano un profilo MLVA diverso da quello delle matrici alimentari (si veda Fig. 6). In particolare, in Fig. 6 è rappresentata la distribuzione spaziale dei casi inizialmente attribuiti al focolaio, confermati (in verde) e non confermati (in arancione) sulla base dell'MLVA, e degli esercizi commerciali nei quali venivano distribuiti prodotti provenienti dall'allevamento in esame (in blu). Successivamente alla eliminazione dei capi nell'allevamento infetto (ottobre), non sono stati individuati in regione Emilia-Romagna ulteriori casi umani con *Salmonella enterica* Enteritidis di genotipo PFGE SXB_PR.0112 e genotipo MLVA 5-6-10-7.



Legenda

- ★ Casi umani confermati in MLVA
 - ★ Casi umani non confermati
 - Esercizi commerciali
 - AUSL Emilia-Romagna
- 0 10 20 30 km

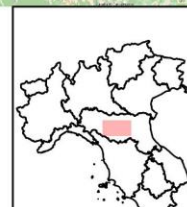


Fig. 6: Distribuzione spaziale degli isolati di *Salmonella enterica* Enteritidis con genotipo SXB_PR.0112 inizialmente attribuiti al focolaio nelle province di Modena e Reggio Emilia (stelle verdi e arancioni). Il numero all'interno della stella rappresenta il numero di casi nell'evento puntuale di tossinfezione. In verde i casi che sono stati confermati appartenere al focolaio sulla base delle analisi di MLVA. In arancione i casi con un profilo MLVA differente da quello ritrovato nelle matrici alimentari associate al focolaio. I punti blu rappresentano gli esercizi commerciali nei quali venivano distribuiti prodotti provenienti dall'allevamento dal quale provenivano le fonti alimentari associate al focolaio. L'analisi spaziale è stata fornita dal Servizio Epidemiologico Veterinario dell'Emilia-Romagna.

Utilizzando il database dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) degli isolamenti di *Salmonella enterica* da matrici animali e alimentari, sono stati riscontrati nell'allevamento in osservazione isolamenti di *Salmonella enterica* Enteritidis con i profili PFGE ed MLVA del focolaio precedenti al periodo di indagine epidemiologica. Tali isolamenti, avvenuti a partire dal 2009, suggeriscono una contaminazione persistente di *Salmonella enterica* Enteritidis all'interno dell'allevamento.

Nel database del Centro Enteretnet presso IZSLER (che tipizza gli isolati di salmonelle umane a partire dal 2012) sono presenti 16 isolamenti di *Salmonella enterica* Enteritidis con PFGE SXB_PR.0112 ed MLVA 5-6-10-7 precedenti all'insorgere del focolaio. Tutti gli isolamenti sono avvenuti nelle province di Modena, Reggio Emilia e Bologna che corrispondono all'area degli esercizi commerciali serviti dall'allevamento in questione, mentre non esistono isolamenti dalle altre province della regione. Nonostante maggiori approfondimenti con tecniche molecolari quali Whole Genome Sequencing (WGS) siano necessari per attribuire con un elevato grado di certezza i casi pregressi alla stessa fonte di infezione, le indagini condotte finora suggeriscono la possibilità di una fonte persistente di infezione che abbia causato casi di salmonellosi in un arco di tempo di oltre quattro anni.

3) Nel periodo aprile-dicembre 2016 è stato rilevato un potenziale focolaio epidemico diffuso in tutta la regione Emilia Romagna che ha interessato 96 casi di tossinfezione da *Salmonella enterica* Enteritidis con genotipo SXB_PR.0727 (si veda Fig. 7).

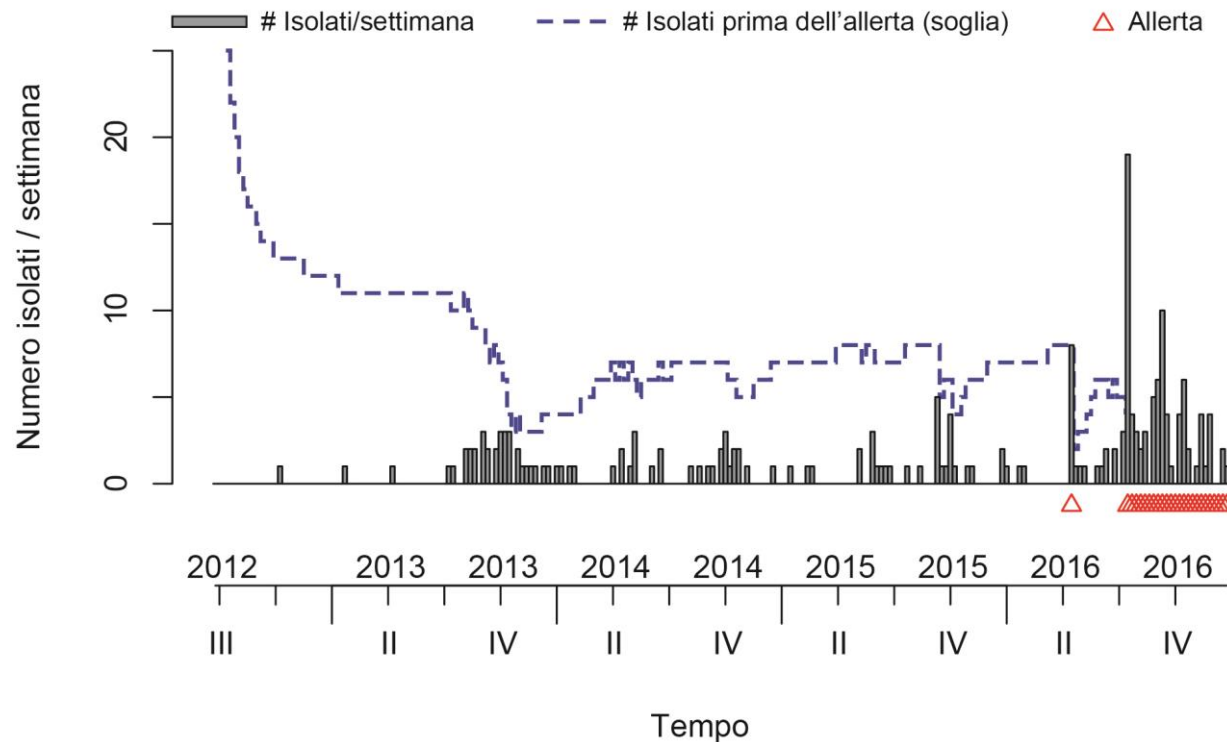


Fig. 7: Andamento nel tempo del numero di isolati settimanali di *Salmonella enterica* Enteritidis con genotipo SXB_PR.0727 in regione Emilia-Romagna (barre grigie). La linea tratteggiata blu indica il numero minimo di casi settimanali previsto dal modello matematico sopra il quale scatta l'allerta epidemica. I triangoli rossi indicano la presenza di un potenziale focolaio diffuso.

Approfondimenti microbiologici effettuati con la tecnica dell'MLVA, hanno permesso di individuare la presenza di quattro diversi genotipi circolanti (4-7-9-8, 4-7-10-8, 4-7-11-8, 4-7-12-8) con profili molto simili tra loro, per un totale di 86 isolati. I rimanenti 10 isolati mostravano profili molto diversi tra loro.

Gli isolati appartenenti al profilo 4-7-12-8 provengono dalle province di Bologna (13 casi), Ferrara (2 casi) e Modena (2 casi) e sono stati quasi esclusivamente isolati nei mesi di settembre-ottobre (15 su 17). Tali considerazioni suggeriscono che si possa trattare di un gruppo di isolati distinto dagli altri. Contrariamente

al profilo 4-7-12-8, gli altri tre profili MLVA presentavano ampie sovrapposizioni sia spaziali che temporali, suggerendo la possibilità che si potesse trattare di varianti genetiche derivate da un'unica fonte di infezione.

Allo scopo di migliorare la comprensione delle dinamiche epidemiologiche in atto, sono state effettuate alcune indagini preliminari con tecniche di Whole-Genome Sequencing (WGS) su alcuni isolati appartenenti ai tre profili MLVA che mostravano ampie sovrapposizioni. Fig. 8 mostra l'albero filogenetico ottenuto partendo dai Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) sulla base di un confronto delle sequenze genomiche di 13 isolati con stesso profilo PFGE (SXB_PR.0727) e con tre differenti profili MLVA (contrassegnati in figura da punti di diversi colori), come in Pettengill et al. (2014).

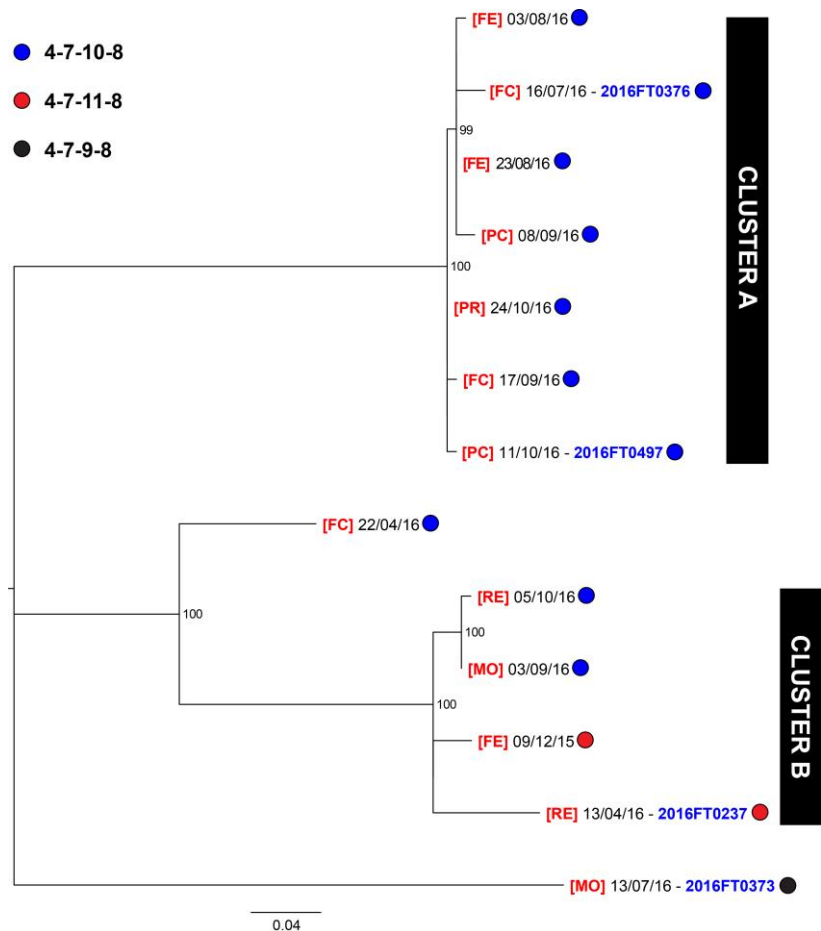


Fig. 8: Albero filogenetico ottenuto da sequenze di 13 isolati con profilo PFGE SXB_PR.0727 e differenti profili MLVA: 4-7-10-8 (punti blu), 4-7-11-8 (punti rossi) e 4-7-9-8 (punto nero). Il codice nell'albero che contraddistingue l'isolato riporta: la provincia di isolamento (in rosso), la data di isolamento (in nero) e l'eventuale appartenenza dell'isolato a un focolaio localizzato (contrassegnato da un codice alfanumerico definito nel sistema informatico regionale SMI, in blu). Ai nodi del cluster sono indicati i valori di bootstrap che, per valori prossimi a 100, indicano l'elevata probabilità di esistenza del cluster sotteso.

L'analisi genomica preliminare mostra la presenza di diversi cluster filogenetici che suggeriscono la presenza di più fonti di contaminazione per i casi di *Salmonella enterica* Enteritidis SXB_PR.0727 con i profili MLVA investigati. Fig. 8 mostra la presenza di un cluster di isolati (cluster A) provenienti da diverse province della regione (Ferrara, Forlì-Cesena, Parma e Piacenza) nei mesi di luglio-ottobre e caratterizzati da uno stesso profilo MLVA (4-7-10-8) e con elevata similarità genomica, suggerendo la presenza di un focolaio diffuso riconducibile a un'unica fonte di contaminazione. Inoltre, mostra la presenza di un cluster di casi (cluster B) con isolamenti avvenuti nell'arco di tempo di quasi un anno (dicembre 2015-ottobre 2016) e caratterizzato da profili MLVA differenti. Il cluster B è caratterizzato da maggiore variabilità rispetto al cluster A che, associata all'ampio range temporale tra gli isolati, suggerisce la possibile presenza di una fonte di contaminazione persistente. Tuttavia, tale conclusione dovrà essere supportata da una più ampia e approfondita analisi genomica che è attualmente in corso.

I primi mesi di sorveglianza per l'anno 2017 evidenziano il perdurare in regione di casi di *Salmonella enterica* Enteritidis SXB_PR.0727 (8 casi nei mesi di gennaio e febbraio).

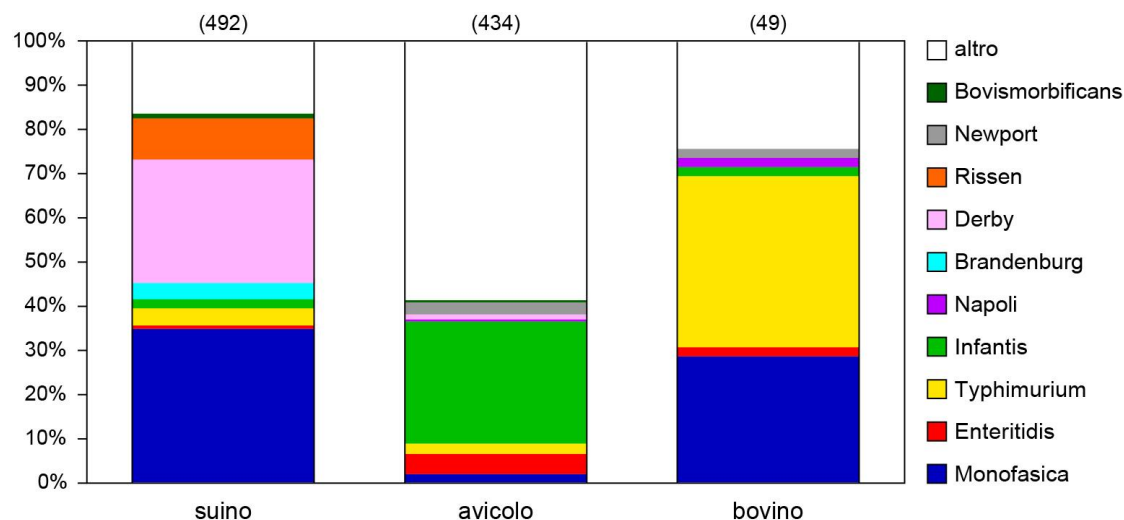
Distribuzione dei principali sierotipi di *Salmonella enterica* nelle matrici alimentari in regione Emilia Romagna

Il Centro di Riferimento Regionale Enteric Emilia-Romagna svolge anche attività di tipizzazione sierologica e genetica degli isolati di *Salmonella enterica* di provenienza alimentare, veterinaria e ambientale provenienti da Lombardia ed Emilia Romagna e depositati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

La frequenza di isolamento nelle principali specie animali utilizzate per la produzione di alimenti è differente. Tale comportamento può essere utilizzato per individuare, in corso di indagine in caso di salmonellosi, la possibile fonte dell'alimento consumato.

In Fig. 9 sono rappresentate le frequenze dei 10 principali sierotipi isolati nell'uomo nel 2016 (corrispondenti all'84% degli isolamenti da uomo) nelle diverse matrici (animali e alimentari) provenienti da suini, bovini e specie avicole (pollo, tacchino).

Fig. 9: Distribuzione delle frequenze in tre matrici alimentari dei 10 sierotipi di *Salmonella enterica* più diffusi tra i casi umani della regione Emilia Romagna. Tra parentesi il numero totale di campioni isolati per ogni matrice.



Bibliografia

Frisén M, Andersson E, Schiöler L. (2009) Robust outbreak surveillance of epidemics in Sweden. *Statistic in Medicine* 28:476-493.

Höhle M, Meyer S, Paul M (2015). Surveillance: Temporal and Spatio-Temporal Modeling and Monitoring of Epidemic Phenomena. R package version 1.9-1. <http://CRAN.R-project.org/package=surveillance>.

Pettengill JB, Luo Y, Davis S, Chen Y, Gonzalez-Escalona N, Ottesen A, Rand H, Allard MW and Errol Strain E. (2014). An evaluation of alternative methods for constructing phylogenies from whole genome sequence data: a case study with Salmonella. *PeerJ*. 2:e620.