

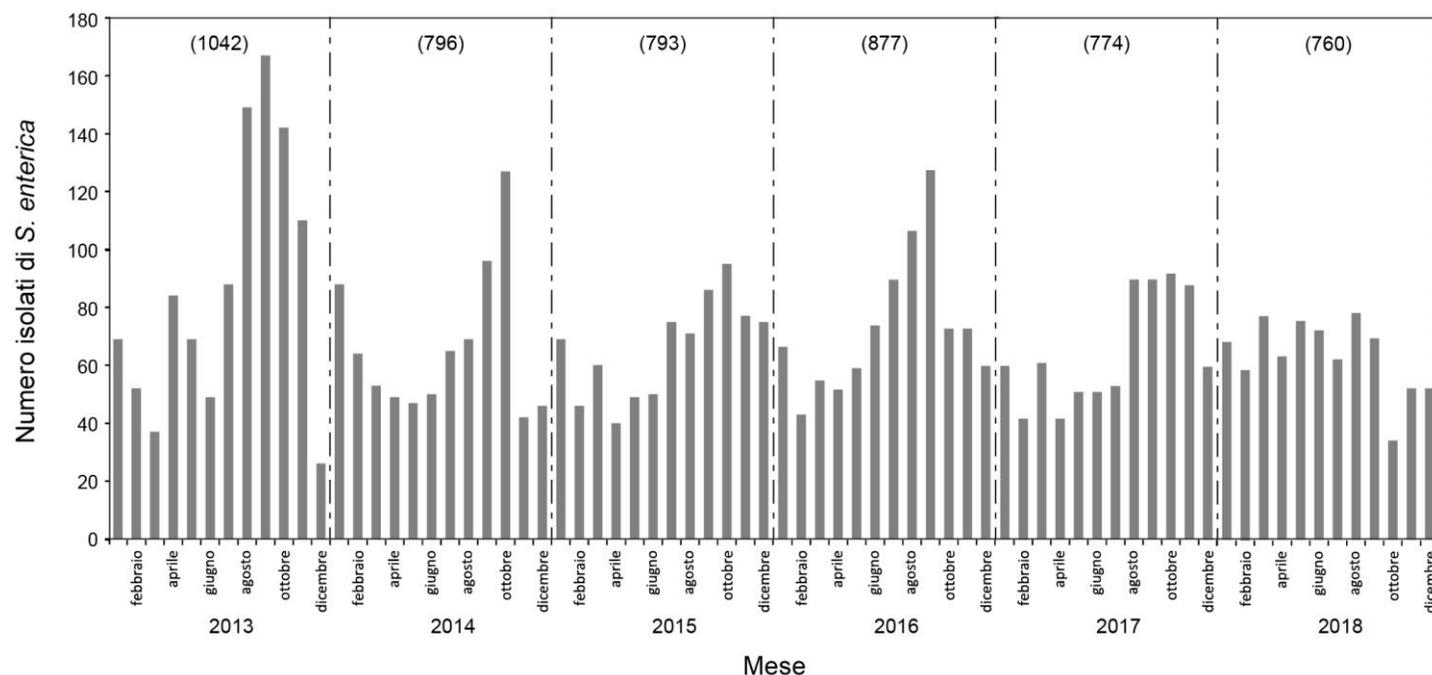


REPORT DELL'ATTIVITÀ DEL CENTRO ENTERNET NELL'ANNO 2018

Maggio 2019

1. Sorveglianza su *Salmonella enterica*

Fig. 1: Isolati per mese di prelievo di *S. enterica* nel periodo 2013- 2018. Tra parentesi il totale degli stipti isolati per anno.



Periodo Gennaio-Dicembre 2018

Il report si riferisce ai 760 stipti di *Salmonella enterica* isolati dai pazienti della Regione Emilia-Romagna nel periodo gennaio-dicembre 2018 e inviati al Centro di Riferimento Regionale Enternet presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER).

Fig. 2: Percentuale di isolati attribuibili ai principali sierotipi (i.e. >2% degli isolamenti nel periodo di osservazione) di *Salmonella enterica* negli anni 2014-2018.

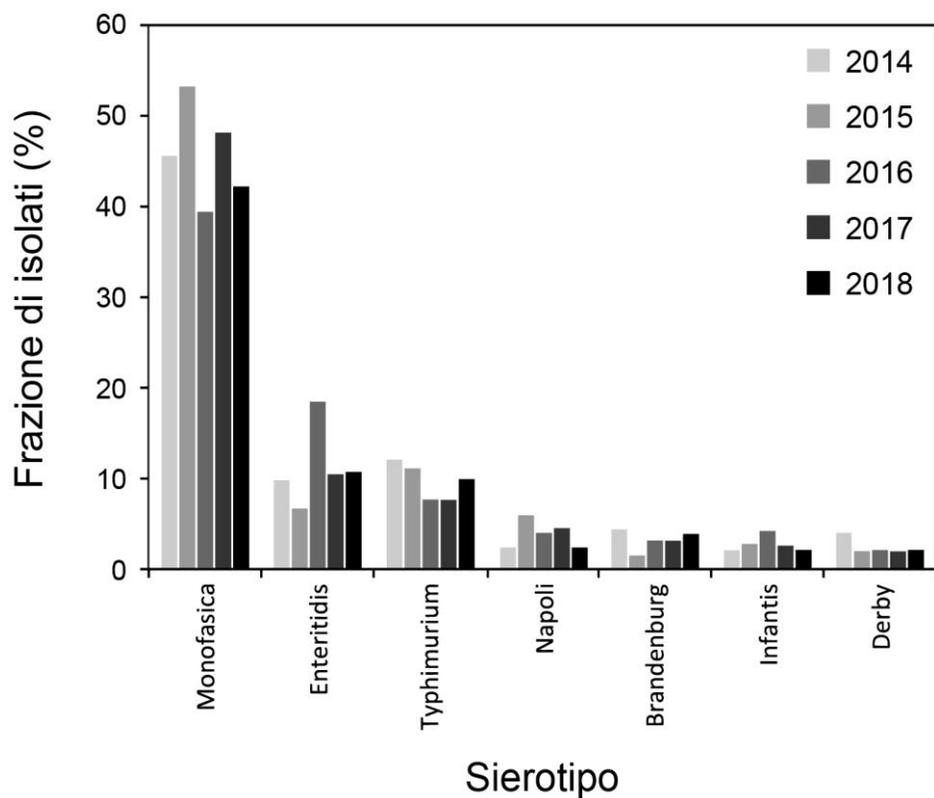
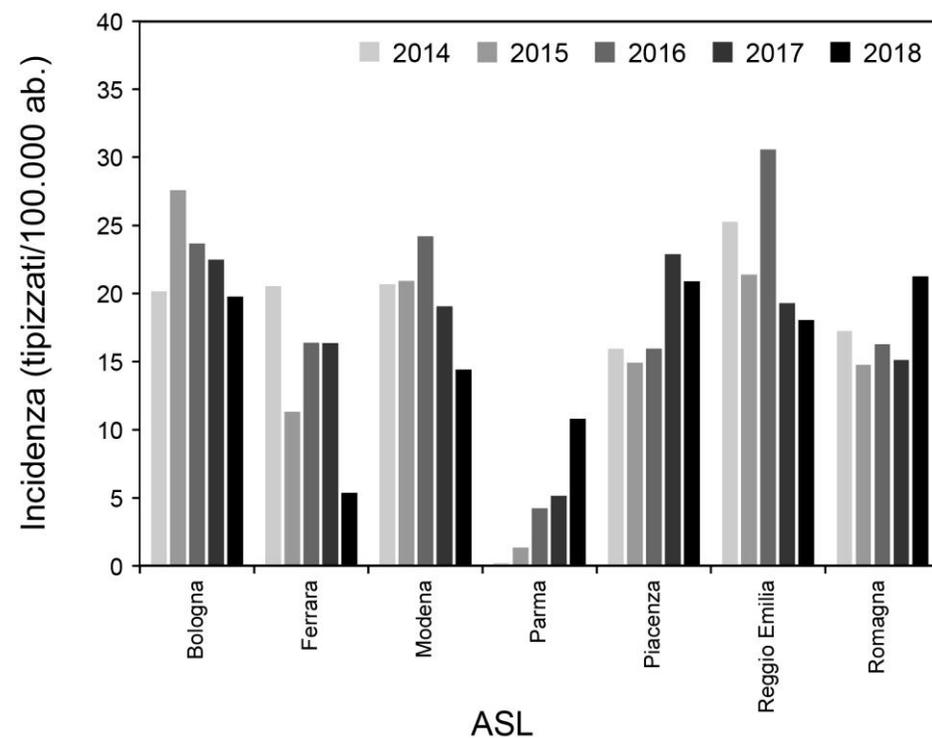


Fig. 3: Isolamento di *Salmonella enterica* per 100.000 abitanti negli anni 2014-2018 in funzione dell'ASL di prelievo.



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

Al Centro di Riferimento Regionale Enteric Emilia-Romagna vengono inviati i ceppi di *Salmonella enterica* isolati dai Laboratori di microbiologia clinica della Regione. I ceppi vengono tipizzati sierologicamente e genotipizzati attraverso diverse tecniche che ne permettono una più fine caratterizzazione utilizzabile a scopo epidemiologico.

A tal fine presso il Centro è attivo un sistema di allerta per l'individuazione di potenziali focolai di salmonellosi. Il sistema è stato realizzato per 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 vengono effettuate con l'ausilio di appositi modelli matematici sulla base della differenziazione genotipica fornita dalla Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE). Alla luce dei dati di serie storiche dell'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, per le analisi di trend, si è scelto di utilizzare 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 Frisé et al. 2009 per maggiori dettagli sul modello). Per individuare situazioni anomale

che possono costituire 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 identificati seguono verosimilmente un andamento crescente (anziché costante). L'analisi viene effettuata attraverso il software statistico R 3.5.2 (The R Foundation for Statistical Computing 2010) e il package 'surveillance' (Höhle et al. 2015).

Il sistema di allerta è in funzione dalla primavera del 2013 e, nell'anno 2018, ha segnalato 6 potenziali focolai di salmonellosi in regione Emilia-Romagna. Tutti questi focolai sono risultati perdurare per diverse settimane e sono stati segnalati al servizio sanitario regionale per le necessarie indagini epidemiologiche.

1.2 Potenziali focolai diffusi di *Salmonella enterica* rilevati nell'anno 2018

Il sistema di allerta per l'individuazione precoce di focolai, basato sull'analisi sistematica dei tracciati PFGE degli isolati di *Salmonella enterica* di origine umana, ha evidenziato, nell'anno 2018, sei potenziali focolai relativi a stipti sierotipizzati e genotipizzati in tempo utile per procedere ad interventi sanitari. Per quattro di questi focolai, allo scopo di migliorare la comprensione delle dinamiche epidemiologiche in atto, sono state effettuate ulteriori indagini con tecniche di Whole-genome sequencing (WGS) sugli isolati provenienti dai casi umani e, quando disponibili, sugli isolati alimentari e animali associati al potenziale focolaio. Per i sierotipi Typhimurium ed Enteritidis, le indagini molecolari in occasione di sospetti focolai si avvalgono anche dei profili MLVA prodotti presso la Sede territoriale di Modena di IZLSER.

Tab. 1: Riepilogo delle informazioni relative ai sei potenziali focolai di salmonellosi segnalati al sistema sanitario per approfondimenti epidemiologici. In tabella è riportato il numero di casi presumibilmente attribuibili al focolaio sulla base della sorveglianza in PFGE (colonna 'Casi presunti') ed, eventualmente, il numero di casi confermati in WGS come appartenenti ad un unico clone (colonna 'Casi confermati in WGS'). La colonna 'Sezione' indica il paragrafo del presente report in cui il focolaio è descritto nel dettaglio.

Cluster ID	Sezione	Casi presunti	Periodo	AUSL Coinvolte	Analisi WGS	Casi confermati in WGS	Isolati catena alimentare confermati in WGS
OB_2018_001	1.2.1	38	dic '17 – apr '18	ROM, BO, PR	NO	-	-
OB_2018_002	1.2.2	19	feb '18 – apr '18	ROM, BO	NO	-	-
OB_2018_008	1.2.3	22	apr '18 – ott '18	RE	SI'	5 + 9*	1 + 1*
OB_2018_005	1.2.4	16	ago '18	PC, BZ	SI'	11	9
OB_2018_006	1.2.5	13	lug '18 – set '18	ROM, BO, MO	SI'	12	1
OB_2018_007	1.2.6	30	lug '18 – ott '18	ROM, BO, RE, PU	SI'	26	3

* L'analisi in WGS ha evidenziato la presenza di 2 cluster genomici distinti

1.2.1 Cluster OB_2018_001: dicembre 2017 – aprile 2018

Nel periodo dicembre 2017-aprile 2018 è stato rilevato un potenziale focolaio epidemico diffuso principalmente nelle province di Ravenna (14 casi), Forlì-Cesena (8 casi) e Rimini (8 casi), ma con casi anche in altre province (Bologna e Parma), costituito da 38 casi di tossinfezione con isolamento di *Salmonella enterica* serovar Typhimurium con genotipo PFGE STYMXB.0070 (Fig. 4). Ulteriori approfondimenti microbiologici effettuati con un secondo metodo di genotipizzazione, Multiple-Locus Variable number tandem repeat analysis (MLVA), hanno permesso di associare a 37

di questi isolati un singolo genotipo MLVA (identificato come 3-12-11-NA-311), mentre il rimanente isolato presentava una differenza in un singolo locus MLVA. Utilizzando il database IZSLER degli isolamenti di *Salmonella enterica* da matrici animali e alimentari, è stato riscontrato uno stipite con il profilo PFGE e il profilo MLVA del focolaio che era stato isolato (circa 1 mese e mezzo prima dell'insorgere dei casi umani) in un muscolo di suino proveniente da uno stabilimento di produzione della provincia di Reggio Emilia.

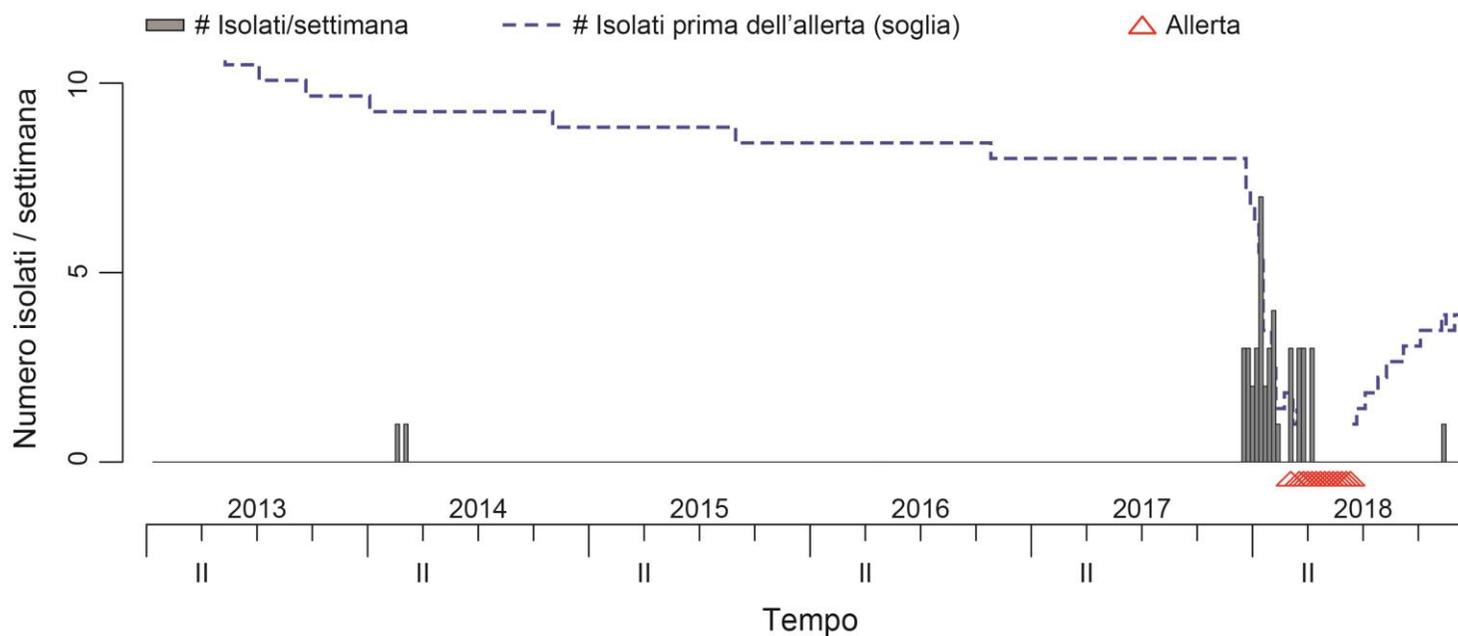


Fig. 4: Andamento nel tempo del numero di isolati settimanali di *Salmonella enterica* serovar Typhimurium con genotipo PFGE STYMXB.0070 in Regione Emilia Romagna (barre grigie). La linea tratteggiata blu indica il numero minimo di casi settimanali previsto dal modello matematico sopra il quale scatta l'allerta epidemica. I triangoli rossi indicano la presenza di un potenziale focolaio diffuso.

1.2.2 Cluster OB_2018_002: febbraio – aprile 2018

Nel periodo febbraio-aprile 2018 è stato rilevato un potenziale focolaio epidemico principalmente diffuso nella provincia di Ravenna, ma con casi in altre province della Romagna e a Bologna, costituito da 19 casi di tossinfezione da *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 4,[5],12:i,- (variante monofasica) con genotipo PFGE STYMXB.0131. Approfondimenti microbiologici effettuati con la tecnica dell'MLVA hanno permesso di associare a tutti i 19 isolati un singolo genotipo MLVA (identificato come 3-13-12-NA-211). L'indagine epidemiologica ha permesso di isolare in una salsiccia passita in possesso di uno dei casi uno stipite con il profilo PFGE e il profilo MLVA del focolaio. L'alimento proveniva da uno stabilimento nella provincia di Ferrara. Ulteriori approfondimenti microbiologici effettuati sullo stesso lotto di prodotto e nello stabilimento di provenienza dell'alimento contaminato non hanno evidenziato ulteriori positività per *Salmonella*.

1.2.3 Cluster OB_2018_008: aprile 2018 / ottobre 2018

Nel mese di aprile 2018 il Servizio di Igiene Pubblica dell'AUSL di Reggio Emilia ha segnalato la presenza di un focolaio familiare (codice SMI 2018FT0140) nell'area di Guastalla che ha interessato 5 casi di tossinfezione da *Salmonella enterica* serovar Enteritidis con genotipo PFGE SXB.0727 e MLVA 2-11-7-3-2. Dall'alimento sospetto (dolce a base di uova preparato in casa) è stato isolato uno stipite di *Salmonella* dello stesso genotipo PFGE e MLVA dei casi.

Nel mese di ottobre 2018 il Servizio di Igiene Pubblica dell'AUSL di Reggio Emilia ha segnalato la presenza di un focolaio familiare (codice SMI 2018FT0336) nell'area di Guastalla costituito da 6 casi di tossinfezione da *Salmonella enterica* serovar Enteritidis con lo stesso genotipo del focolaio 2018FT0140. Dall'alimento sospetto (pasta all'uovo fatta in casa) è stato isolato uno stipite di *Salmonella* dello stesso genotipo PFGE e MLVA dei casi (e del focolaio precedente). Approfondimenti microbiologici effettuati sul pollaio familiare da cui originavano le uova per il confezionamento dell'alimento contaminato hanno dato esito negativo.

Inoltre, nella stessa zona erano stati segnalati, nell'anno 2018, altri 11 casi di tossinfezione da *S. Enteritidis* avente stesso genotipo dei focolai familiari che non risultavano epidemiologicamente connessi ai due focolai.

Allo scopo di verificare se i due focolai familiari (e i casi sporadici) fossero stati causati da una fonte di infezione comune, sono state effettuate alcune indagini con tecniche di Whole-Genome Sequencing (WGS) sugli isolati umani e alimentari provenienti dalla zona di Guastalla nel 2018. Le analisi hanno evidenziato che gli isolati di 2018FT0140 e 2018FT0336 non sono genomicamente correlati, mentre 3 dei 7 casi sporadici (isolati nel mese di gennaio 2018) clusterizzano con il focolaio 2018FT0336 (verificatosi nell'ottobre 2018). Questo risultato suggerisce che la fonte di infezione di 2018FT0336 fosse già attiva molti mesi prima del verificarsi dell'evento epidemico.

1.2.4 Cluster OB_2018_005: agosto 2018

Nel periodo agosto 2018, a seguito di un evento di tossinfezione (2 casi) avvenuto in un ristorante della provincia di Piacenza segnalato dall'AUSL di competenza (codice SMI: 2018FT0336), è stato rilevato un potenziale focolaio epidemico diffuso nella provincia di Piacenza che ha interessato 11 casi di tossinfezione da *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) con genotipo PFGE SXB_PR.0727. Approfondimenti microbiologici effettuati con la tecnica dell'MLVA, hanno permesso di associare a tutti questi isolati un singolo genotipo MLVA (denominato 4-7-10-8). Nello stesso periodo sono stati isolati 3 stipiti di *Salmonella* con lo stesso genotipo del focolaio nelle province di Parma e Bologna. Indagini epidemiologiche effettuate dall'AUSL Piacenza nell'ambito dell'evento di tossinfezione 2018FT0336 hanno permesso di identificare casi di salmonellosi potenzialmente collegati al ristorante in esame in regione Piemonte e nella provincia di Bolzano. Il Centro ha ricevuto dalle autorità competenti della provincia di Bolzano 2 stipiti di *Salmonella* relativi a casi in questione. Le analisi PFGE e MLVA hanno confermato che gli stipiti ricevuti hanno lo stesso genotipo del focolaio. Inoltre, dal ristorante in esame (e dall'allevamento di pollame a conduzione familiare annesso ad esso) sono stati isolati stipiti di *S. Enteritidis* da alimenti (uova e pasta fresca) e dall'ambiente (feci, tamponi cloacali, lettiere e mangimi) aventi genotipo PFGE ed MLVA del focolaio.

Tuttavia, SXB_PR.0727 rappresenta il principale genotipo di *S. Enteritidis* circolante in regione e, come evidenziato da analisi effettuate in precedenza, l'appartenenza a questo genotipo non implica strettamente che i casi siano riconducibili a una fonte di infezione comune (si veda il

report 2016). Quindi, allo scopo di migliorare la comprensione delle dinamiche epidemiologiche in atto, sono state effettuate alcune indagini con tecniche di WGS sugli isolati umani, alimentari e animali associati al potenziale focolaio. Fig. 5 mostra l'albero filogenetico ottenuto partendo dai Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) sulla base di un confronto delle sequenze genomiche di 26 isolati: 16 casi del presunto focolaio, 4 isolati dagli alimenti sospetti, 5 dall'allevamento sospetto e un isolato utilizzato come outgroup (si veda maggiori dettagli metodologici Morganti et al. 2018). L'analisi genomica mostra la presenza di un cluster filogenetico che comprende 9 casi dalla provincia di Piacenza, 2 casi dalla provincia di Bolzano e gli stipiti isolati dagli alimenti e dall'allevamento sospetto (area in grigio). Tale cluster è caratterizzato da elevata similarità genomica con differenze *pairwise* tra stipiti umani e stipiti provenienti dagli alimenti e dall'allevamento sospetto di 0-4 SNPs (mediana = 2). Lavori retrospettivi effettuati in WGS su focolai di *S. Enteritidis* suggeriscono che cluster di isolati aventi differenze *pairwise* nel range 0-6 SNPs siano da considerarsi appartenenti allo stesso focolaio (Boxrud & Wolfgang 2017). Questo risultato suggeriva che le fonti alimentari di infezione provenissero dall'allevamento sospetto. Sulla base del risultato genomico, sono state condotte ulteriori analisi epidemiologiche di: 1) *trace-forward* delle uova provenienti dall'allevamento sospetto verso i punti vendita; e 2) *trace-back* dei punti di acquisto da parte dei casi umani di prodotti a base di uova. Queste analisi hanno mostrato diverse corrispondenze tra punti vendita e punti di acquisto delle uova dell'allevamento, confermando epidemiologicamente quanto indicato dal dato genomico.

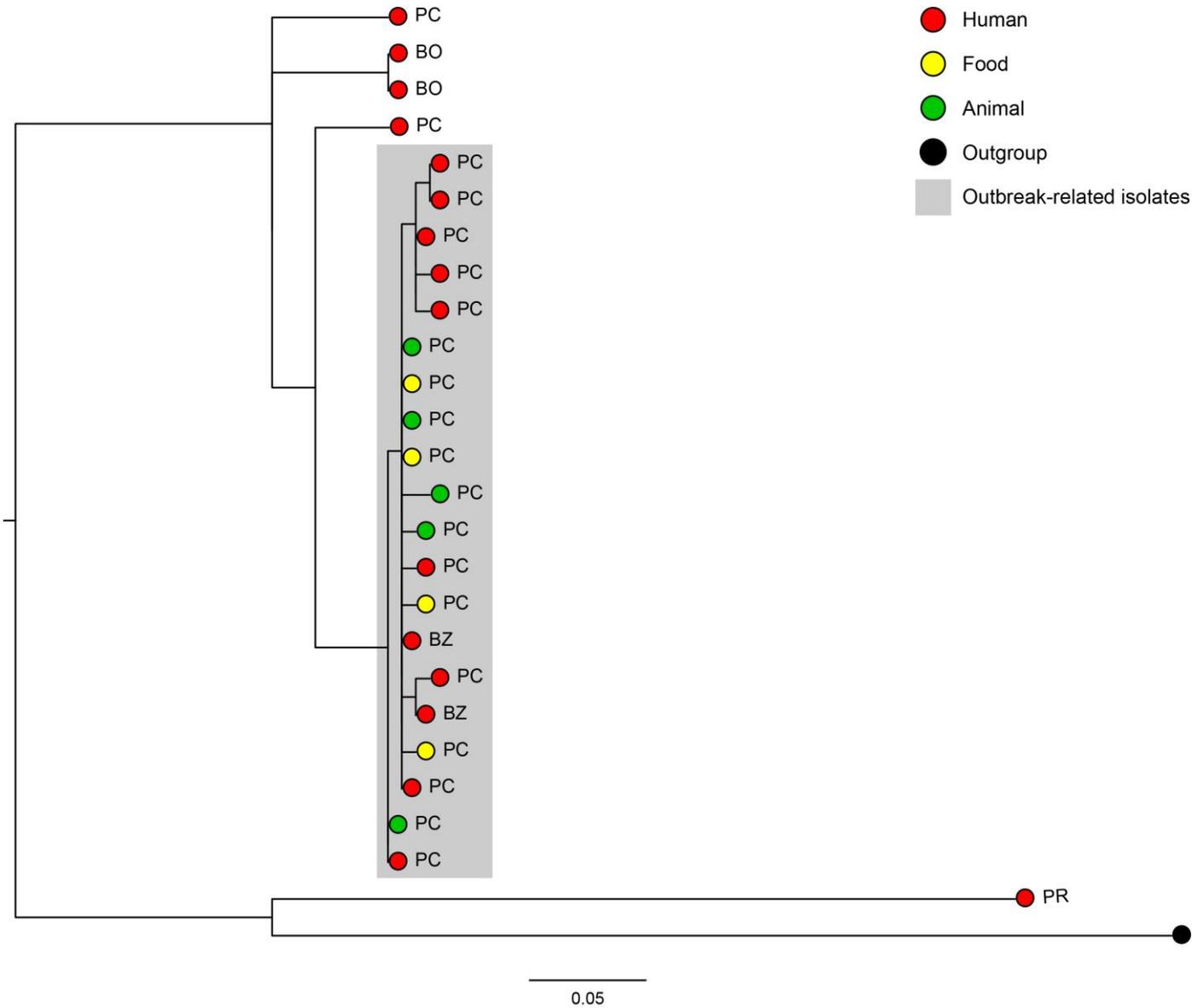


Fig. 5: Albero filogenetico ottenuto da sequenze di 26 isolati di *S. Enteritidis* con profilo PFGE SXB_PR.0727. Il codice colore dei punti specifica l'origine degli isolati (si veda la legenda). L'area in grigio comprende gli isolati appartenenti al clone outbreak.

1.2.5 Cluster OB_2018_006: luglio – settembre 2018

Nel periodo luglio-settembre 2018 è stato rilevato un potenziale focolaio epidemico diffuso costituito da 13 casi di tossinfezione da *Salmonella enterica* serovar Goldcoast (*S. Goldcoast*) nelle aree della Romagna (6 casi), Bologna (4 casi) e Modena (3 casi). Gli isolati appartenenti al potenziale focolaio risultano non tipizzabili in PFGE poiché non presentano un pattern di elettroforesi analizzabile (DNA autodegradante).

Dal database IZSLER degli isolamenti da matrici animali e alimentari sono stati riscontrati due isolamenti da matrici alimentari aventi sierotipo *S. Goldcoast* e DNA autodegradante. Specificatamente, una salsiccia prelevata in uno stabilimento nella provincia di Modena e uno spiedino prelevato in una macelleria in provincia di Rimini, isolati rispettivamente 3 settimane e una settimana prima dei casi umani. Allo scopo di migliorare la comprensione delle dinamiche epidemiologiche in atto vista la mancanza del dato di tipizzazione PFGE, sono state effettuate alcune indagini con tecniche di WGS sugli isolati umani e alimentari associati al potenziale focolaio. Fig. 6 mostra l'albero filogenetico ottenuto partendo dai Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) sulla base di un confronto delle sequenze genomiche di 15 isolati: 13 casi del presunto focolaio, 2 isolati dalle matrici alimentari (si vedano maggiori dettagli metodologici in Morganti et al. 2018). L'analisi genomica mostra la presenza di un cluster filogenetico (avente sequence type ST358) che comprende 12 casi e l'isolato proveniente dalla macelleria Riminese (area in grigio). Tale cluster è caratterizzato da elevata similarità genomica con differenze *pairwise* tra isolati umani e isolato alimentare di 0-2 SNPs (mediana = 1). Questo risultato suggerisce che la fonte alimentare di infezione possa avere un'origine comune con l'isolato proveniente dalla macelleria Riminese.

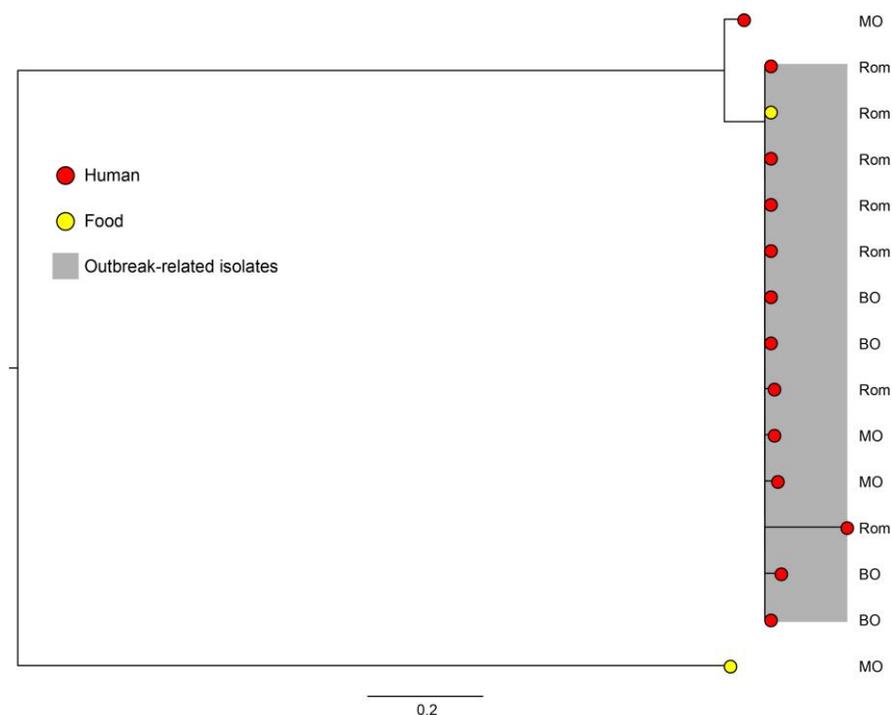


Fig. 6: Albero filogenetico ottenuto da sequenze di 15 isolati di *S. Goldcoast*. Il codice colore dei punti specifica l'origine degli isolati (si veda la legenda). L'area in grigio comprende gli isolati appartenenti al clone outbreak (ovvero con differenze *pairwise* ≤ 6 SNPs). Le sigle associate alle foglie dell'albero identificano l'area di provenienza. BO: Bologna, MO: Modena, Rom: Romagna.

1.2.6 Cluster OB_2018_007: luglio – ottobre 2018

Nel periodo luglio-ottobre 2018 è stato rilevato un potenziale focolaio epidemico diffuso costituito da 18 casi di tossinfezione da *Salmonella enterica* serovar Coeln (*S. Coeln*) nell'area dell'AUSL Romagna (15 casi), Bologna (2 casi) e Reggio Emilia (1 caso). Gli isolati appartenenti al potenziale focolaio risultano non tipizzabili in PFGE poiché non presentano un pattern di elettroforesi analizzabile (DNA autodegradante).

Nello stesso periodo sono stati rilevati 12 casi di tossinfezione da *S. Coeln* nella provincia di Pesaro-Urbino (PU). Inoltre, isolamenti di *S. Coeln* sono stati effettuati nella provincia di PU in acque superficiali. Inoltre, in regione Marche sono stati registrati 3 casi di *S. Coeln* nel 2017. Il nostro laboratorio ha ricevuto dal Centro di Riferimento Regionale Enteric Marche gli isolati di *S. Coeln* relativi ai casi di tossinfezione marchigiani (2017-2018) e ai campionamenti ambientali e, allo scopo di migliorare la comprensione delle dinamiche epidemiologiche in atto vista la mancanza del dato di tipizzazione PFGE, ha effettuato alcune indagini con tecniche di WGS sugli isolati umani e alimentari associati al potenziale focolaio. Fig. 7 mostra l'albero filogenetico ottenuto partendo da SNPs sulla base di un confronto delle sequenze genomiche di 43 isolati (si veda maggiori dettagli metodologici Morganti et al. 2018). L'analisi genomica mostra la presenza di un cluster filogenetico (avente sequence type ST1995) che comprende tutti i 15 casi dell'AUSL Romagna, 11 casi marchigiani e 3 isolati ambientali provenienti dalle acque della diga del lago di Mercatale (PU), area in grigio in Fig. 7. Tale cluster è caratterizzato da elevata similarità genomica con

differenze *pairwise* tra isolati di 0-4 SNPs (mediana = 1). Questo risultato suggeriva fortemente che i casi romagnoli e marchigiani potessero avere una fonte di infezione comune e che questa fonte avesse origine nella zona del lago di Mercatale.

Analisi epidemiologiche effettuate dal Servizio di Igiene Pubblica dell'AUSL Romagna, sulla base delle interviste sulle abitudini alimentari dei 15 casi di salmonellosi, hanno evidenziato che: 5 casi appartenenti al cluster focolaio avevano consumato porchetta presso la fiera di Pugliano (PU), 3 casi appartenenti al cluster avevano acquistato porchetta ai mercati di Cesena e Mercato Saraceno presso un autobanco che acquista maiali al macello di Mercatale (la cui ubicazione è attigua all'omonima diga) e altri 3 casi appartenenti al cluster hanno riportato di aver consumato porchetta acquistata presso il mercato di Villa Verucchio (RN) e da un ambulante a Villagrande (PU). Analisi epidemiologiche effettuate dal Servizio di Igiene Pubblica in Regione Marche, sulla base delle interviste sulle abitudini alimentari degli 11 casi di salmonellosi, hanno evidenziato che: 1 caso appartenente al cluster focolaio aveva consumato porchetta presso la fiera di Pugliano (PU), 4 casi appartenenti al cluster avevano acquistato porchetta al mercato di Mercatale e 1 caso aveva acquistato porchetta presso una macelleria di Mercatale.

Ulteriori approfondimenti epidemiologici e microbiologici da parte delle Autorità Competenti della Regione Marche nella zona del Lago di Mercatale sono ancora in corso.

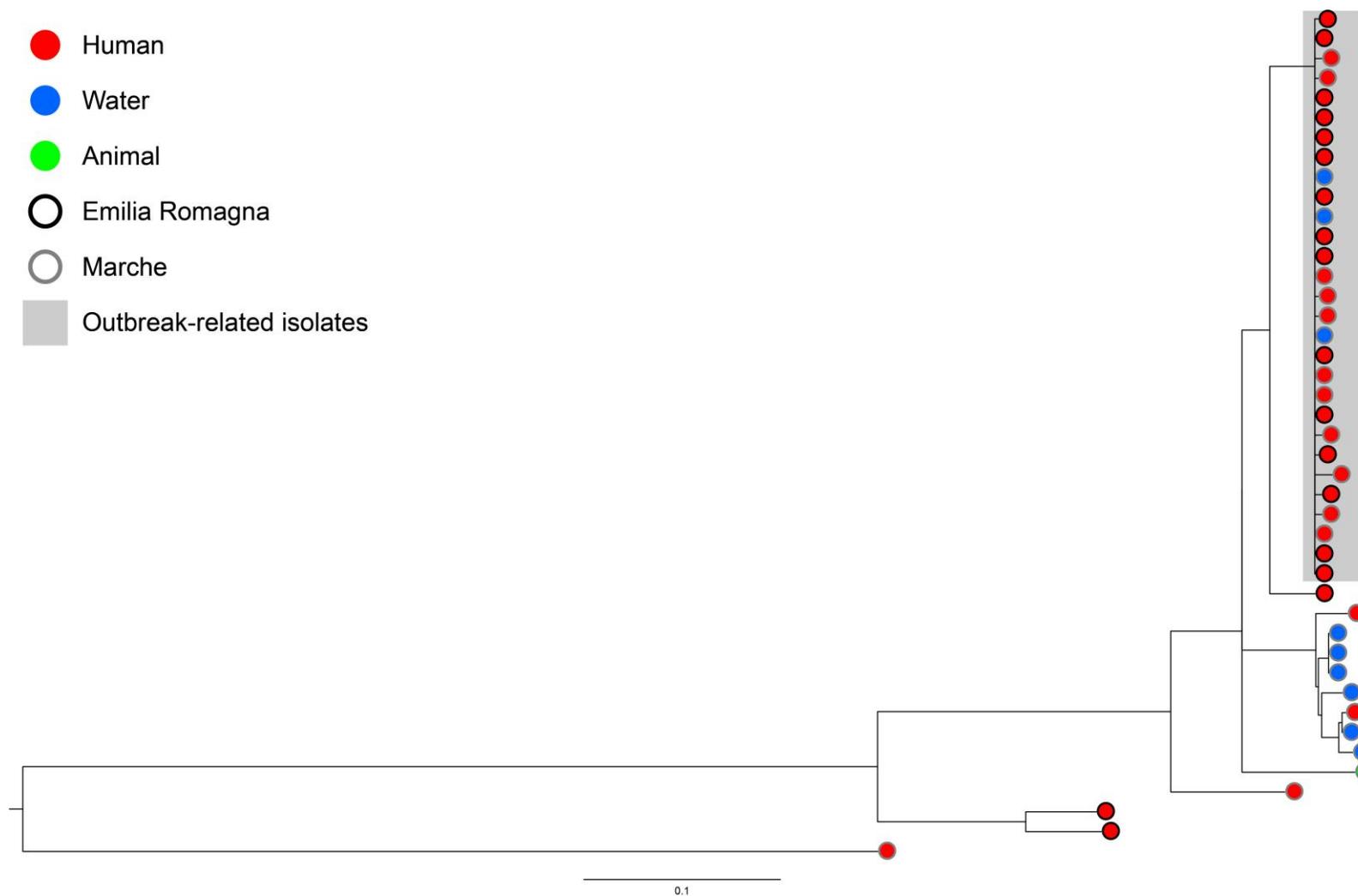


Fig. 7: Albero filogenetico ottenuto da sequenze di 43 isolati di *S. Coeln* provenienti da Emilia Romagna e Marche. Il codice colore dei punti specifica l'origine degli isolati (si veda la legenda). L'area in grigio comprende gli isolati appartenenti al clone outbreak.

2. Sorveglianza su *Listeria monocytogenes*

La Fig. 8 mostra l'andamento nel tempo su base annua degli isolamenti di *Listeria monocytogenes* in regione Emilia Romagna nel periodo 2013-2018. A partire dagli ultimi mesi del 2017 il Centro di Riferimento Regionale Enteric Emilia-Romagna svolge anche attività di sorveglianza su *L. monocytogenes* basata su metodiche di Whole-Genome Sequencing (WGS). Tale sorveglianza è diventata sistematica nel gennaio 2018. L'identificazione di potenziali focolai si svolge in due fasi. 1) L'analisi preliminare per l'individuazione di cluster genomici che possono costituire potenziali focolai viene effettuata con l'approccio di *core-genome MLST* (cgMLST) che si basa sull'analisi di un set di oltre 1700 geni di *L. monocytogenes* precedentemente validati (Moura et al. 2016). La letteratura scientifica su cgMLST di *Listeria monocytogenes* suggerisce l'utilizzo di un cut-off di massimo 7 mismatch allelici per la definizione dei cluster genomici (equivalente a una similarità minima del 99.6% tra genomi, Moura et al. 2016). 2) Nel caso il cgMLST identifichi cluster genomici che possono costituire un potenziale focolaio, indagini supplementari vengono effettuate con analisi di SNPs analogamente a quanto descritto per *Salmonella* (si veda Morganti et al. 2018).

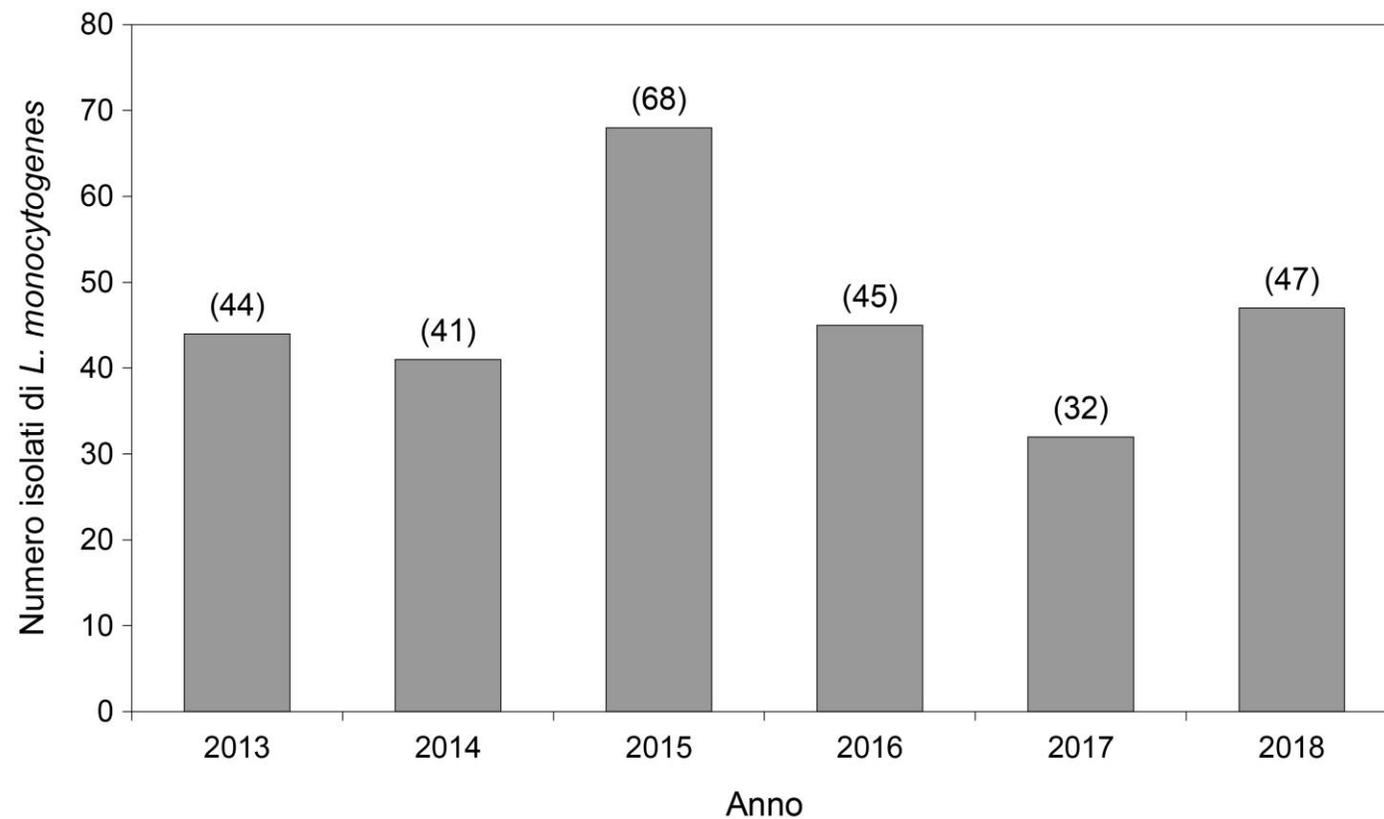
Analisi effettuate allo scopo di identificare le priorità di intervento su focolai causati da enteropatogeni hanno mostrato che l'indagine di cluster con quattro o più casi porta con maggior probabilità all'identificazione della sorgente di infezione rispetto a cluster più piccoli (Rounds et al. 2007; Rounds et al. 2012). Coerentemente con questi risultati il Centro segnala al Servizio Sanitario Regionale la presenza di potenziali focolai di *L. monocytogenes* quando: i) individua cluster genomici (con similarità

>99.6%) di 4 o più casi umani; ii) individua cluster genomici di 1 o più casi umani e uno o più isolati alimentari.

Siccome è noto in letteratura che i focolai di *L. monocytogenes* possono perdurare per mesi o anni, il Centro ha effettuato un'analisi retrospettiva in WGS di tutti gli isolati di *L. monocytogenes* del 2017 allo scopo di identificare eventuali focolai diffusi nel periodo 2017-2018. La Fig. 9 rappresenta l'analisi dei cluster basata sui profili di cgMLST degli stipiti di *L. monocytogenes* isolati nel 2017 e 2018. La figura mostra la presenza di 12 cluster genomici aventi 2-3 isolati caratterizzati da un numero di mismatch allelici inferiore al cut-off (evidenziati in verde). Se da un lato questa evidenza indica la potenziale esistenza di fonti comuni di infezione tra i casi all'interno dei cluster, il ridotto numero di casi in questi cluster renderebbe difficile l'identificazione di queste fonti. Fig. 9 mostra anche la presenza di 3 cluster genomici aventi 4 o più isolati (evidenziati in rosso), cluster che sono stati segnalati per approfondimenti epidemiologici.

E' interessante evidenziare che solo 34 degli stipiti isolati (43%) non appartiene ad un cluster genomico. Questo suggerisce che i casi sporadici di *L. monocytogenes* in regione siano minoritari rispetto a quelli generati da focolai epidemici. Inoltre, in 10 dei 15 cluster messi in evidenza gli isolati provengono da AUSL diverse e in 5 di questi sono presenti stipiti isolati sia nel 2017 sia nel 2018. Questo suggerisce che, in prevalenza, *L. monocytogenes* generi in regione focolai diffusi e di lungo periodo, come già evidenziato a livello europeo (van Walle et al. 2018). Ne consegue, che i focolai di *L. monocytogenes* in regione sono molto difficili da individuare in assenza di tecniche di tipizzazione genomica avanzate.

Fig. 8: Isolati di *L. monocytogenes* per anno di prelievo nel periodo 2013-2018. Tra parentesi il totale degli stipiti isolati per anno.



Periodo Gennaio-Dicembre 2018

Il report si riferisce ai 47 stipiti di *Listeria monocytogenes* isolati dai pazienti della Regione Emilia-Romagna nel periodo gennaio-dicembre 2018 e inviati al Centro di Riferimento Regionale Enteric presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER).

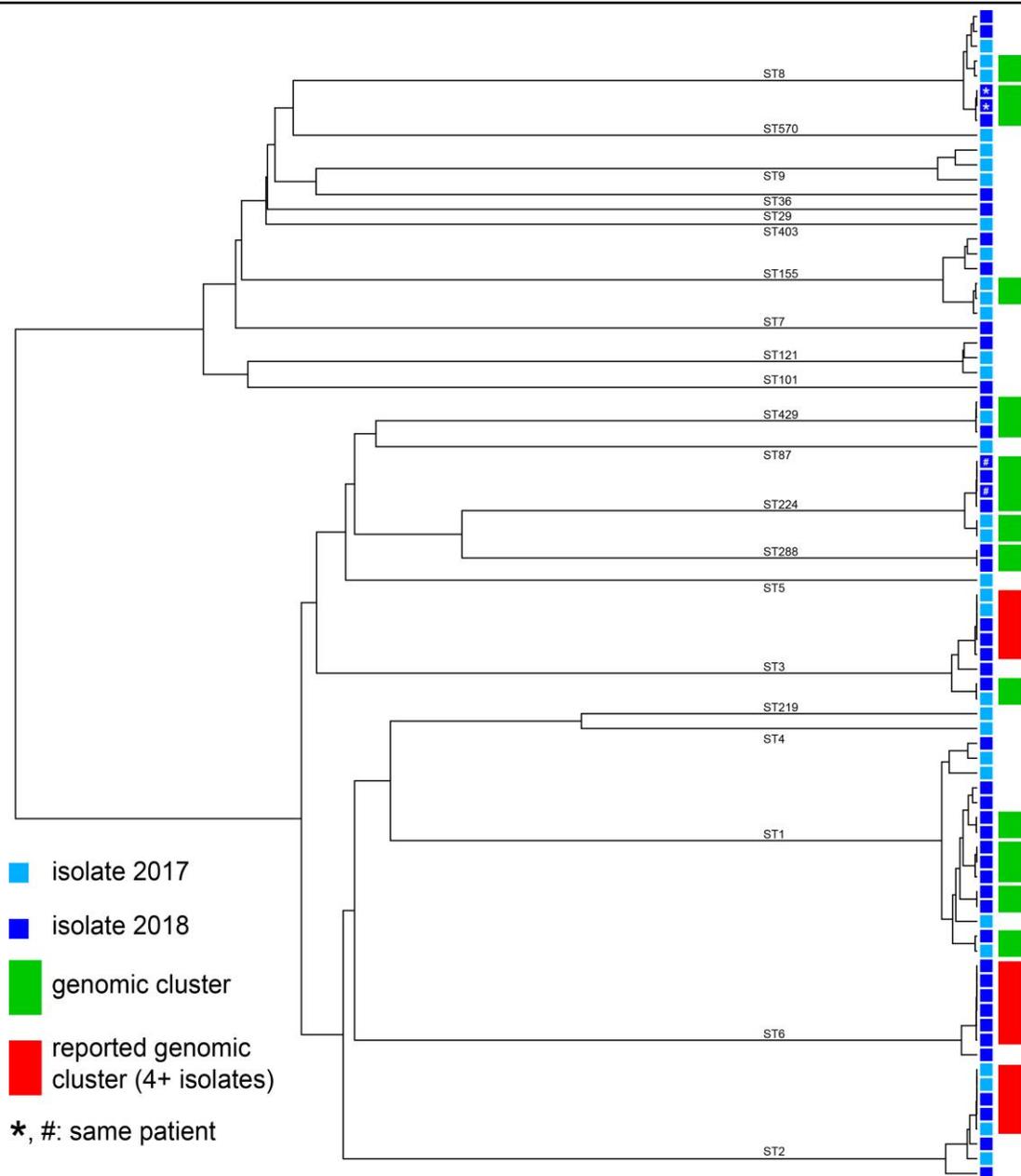


Fig. 9: Cluster analisi basata sui profili di cgMLST di 79 isolati di *L. monocytogenes* isolati in pazienti in regione Emilia-Romagna nel 2017 (32, in azzurro) e 2018 (47, in blu). Le aree verdi evidenziano i cluster genomici caratterizzati da percentuali di similarità di cgMLST superiori al 99.6% con 2-3 isolati. Le aree rosse evidenziano i cluster genomici con similarità >99.6% aventi 4 o più isolati che sono stati segnalati per approfondimenti epidemiologici. Il sequence type (ST) degli isolati è riportato sui bracci dell'albero.

2.1 Potenziali focolai diffusi di *L. monocytogenes* rilevati nell'anno 2018

Attraverso le analisi eseguite presso il Centro Regionale Enternet degli isolati di *Listeria monocytogenes* di origine umana sequenziati in WGS (effettuate con schema allelico in cgMLST) sono stati evidenziati, nell'anno 2018, tre potenziali focolai relativi a isolamenti analizzati in tempo utile per procedere ad allerte sanitarie. Nel caso fossero presenti stipiti di *L. monocytogenes* isolati nella catena alimentare, il Centro ha provveduto a verificare l'eventuale appartenenza a cluster genomici di questi isolati.

Tab. 2: Riepilogo delle informazioni relative ai cluster genomici di *L. monocytogenes* rilevati in WGE e segnalati alle Autorità Competenti per approfondimenti epidemiologici. La colonna 'Sezione' indica il paragrafo del presente report in cui il focolaio è descritto nel dettaglio.

Cluster ID	Sezione	Casi confermati in WGS	Periodo	AUSL Coinvolte	Isolati catena alimentare confermati in WGS
OB_2018_003	2.1.1	5	apr '17 – lug '18	PC, ROM, RE, FE	0
OB_2018_004	2.1.2	5	mag '17 – ago '18	BO, RE	0
OB_2018_009	2.1.3	6	sett '18 – nov '18	PC, ROM, PR	4

2.1.1 Cluster OB_2018_003: aprile 2017 – luglio 2018

Nel periodo aprile 2017 - luglio 2018 è stato rilevato un potenziale focolaio epidemico diffuso nelle province di Piacenza (2 casi), Forlì Cesena, Reggio Emilia e Ferrara (1 caso ciascuno) che ha interessato 5 casi di tossinfezione con isolamento di *L. monocytogenes* di sierogruppo IIb e con sequence type ST3. Le analisi epidemiologiche non hanno evidenziato possibili fonti di contaminazione comuni ai casi isolati.

2.1.2 Cluster OB_2018_004: maggio 2017 – agosto 2018

Nel periodo maggio 2017 - agosto 2018 è stato rilevato un potenziale focolaio epidemico diffuso nelle province di Bologna (4 casi) e Reggio Emilia (1 caso) che ha interessato 5 casi di tossinfezione con isolamento di *L. monocytogenes* di sierogruppo IVb e con sequence type ST2. Le analisi epidemiologiche non hanno evidenziato possibili fonti di contaminazione comuni ai casi isolati.

2.1.3 Cluster OB_2018_009: settembre 2018 – novembre 2018

Nel periodo settembre 2018 - novembre 2018 è stato rilevato un potenziale focolaio epidemico diffuso nelle AUSL di Romagna (3 casi), Piacenza (2 casi) e Parma (1 caso) che ha interessato 6 casi (con 3 decessi) di tossinfezione con isolamento di *L. monocytogenes* di sierogruppo IVb e con sequence type ST6. Le analisi epidemiologiche hanno rilevato i punti di acquisto abituali di generi alimentari considerati a rischio (nello specifico, salumi e latticini) di 4 casi appartenenti al cluster. In 3 di questi punti di acquisto sono stati effettuati approfondimenti microbiologici su superfici dei banchi salumi e latticini. In due punti di acquisto, uno nella provincia di Piacenza e uno nella provincia di Ravenna (appartenenti a catene di esercizi commerciali differenti), sono stati isolati 4 stipiti di *L. monocytogenes* appartenenti al cluster focolaio su un'affettatrice e un piano di lavoro

(a Piacenza) e su un'affettatrici e un coltello per i salumi (a Ravenna).
 Dettagli in Fig. 10.

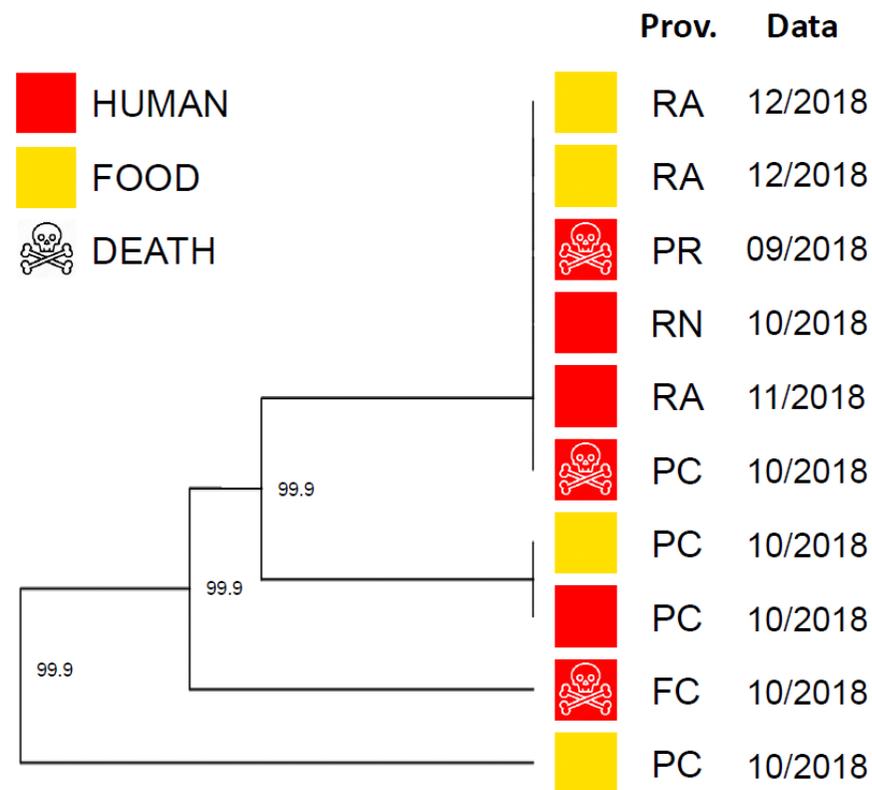


Fig. 10: Cluster analisi di cgMLST ottenuta da sequenze di 10 isolati di *L. monocytogenes* ST6 appartenenti al cluster 2.1.3. Il codice colore dei punti specifica l'origine degli isolati (si veda la legenda). I numeri ai nodi rappresentano la percentuale di similarità tra isolati.

3. Attività di sorveglianza a supporto di enti Nazionali e Internazionali

Il Centro di Riferimento Regionale EnterNet dell'Emilia Romagna è inserito in un circuito di laboratori nazionali e internazionali che partecipano alla sorveglianza microbiologica di malattie a trasmissione alimentare. In questo contesto, il centro riceve allerte sulla presenza di focolai in corso a livello nazionale ed europeo da parte degli enti preposti a tale sorveglianza, quali lo European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) e l'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

Grazie all'utilizzo di tecniche di sequenziamento WGS, è possibile accertare se stipiti di enterobatteri isolati in regione Emilia Romagna siano parte di focolai più estesi (a livello nazionale o europeo) confrontandone il genoma con quello di isolati di riferimento (di cui sia nota su base epidemiologica/microbiologica l'appartenenza a un focolaio).

Nell'anno 2018 il Centro ha fornito supporto per le indagini relative a 5 allerte su *Salmonella enterica* e 2 allerte su *Listeria monocytogenes* diffuse su scala europea.

3.1. Allerte internazionali su *S. enterica*

- Il Communicable Disease Threats Report, week 22, di ECDC (ECDC 2018) riportava l'esistenza di un focolaio di *S. Agona* con 134 casi confermati in WGS diffuso tra il 2015 e il 2018 in UK (115), Finlandia (16), Danimarca (2) e Irlanda (1). Il coordinamento nazionale EnterNet presso l'ISS ha richiesto al Centro di verificare se fossero disponibili genomi di isolati clinici in Emilia Romagna negli anni 2017 e 2018. Nel periodo di riferimento erano state isolate in Emilia Romagna 5 *S. Agona* aventi 5 diversi profili PFGE. Il Centro

ha sequenziato i 5 stipiti di *S. Agona* e inviato le sequenze all'ECDC per l'analisi. L'analisi genomica effettuata dall'ECDC utilizzando lo schema allelico cgMLST sviluppato in Enterobase ha evidenziato che gli stipiti inviati non appartenevano al focolaio sottoposto ad indagine.

- Il coordinamento nazionale EnterNet ha segnalato la presenza di un focolaio di 17 casi causato da *S. Typhimurium* con profilo MLVA 2-17-NA-NA-211 in corso in Svezia dal 2014 al 2018. Al Centro è stato richiesto di verificare se erano presenti isolati clinici con quel profilo in Emilia Romagna ed eventualmente di verificare in WGS la similarità con il genoma di riferimento del focolaio. In Emilia Romagna erano presenti 7 isolati clinici nel periodo di riferimento. Nessuno di questi isolati presentava un grado di similarità elevato con il genoma del focolaio (differenze >90 SNPs).

- Il coordinamento nazionale EnterNet ha segnalato una richiesta urgente di informazioni epidemiologiche e microbiologiche da parte di ECDC circa l'isolamento di *S. Kentucky* produttrici di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) a seguito di un incremento di isolati con queste caratteristiche in alcuni paesi europei (EFSA/ECDC 2018). Al Centro è stato richiesto di verificare la presenza di isolati clinici con quel profilo di antibiotico resistenza in Emilia Romagna. L'analisi svolte sia in microdiluizione (MIC) che con metodo Kirby-Bauer hanno evidenziato che tutti gli stipiti di *S. Kentucky* isolati in Emilia Romagna sono risultati sensibili a cefotaxime.

- Facendo seguito di una richiesta urgente di informazioni epidemiologiche e microbiologiche da parte di ECDC in relazione a un focolaio multi-stato di *S. Coeln* in Europa, il coordinamento nazionale EnterNet ha richiesto al Centro di inviare ad ECDC alcuni genomi di riferimento relativi al focolaio

diffusosi in Emilia Romagna e Marche nel 2018 causato appunto da *S. Coeln* (vedi Sezione 1.2.6). L'analisi genomica effettuata dall'ECDC utilizzando lo schema allelico cgMLST sviluppato in Enterobase ha evidenziato che gli stipiti inviati non appartenevano al focolaio multi-stato sottoposto ad indagine da ECDC.

- Facendo seguito di una richiesta urgente di informazioni epidemiologiche e microbiologiche da parte di ECDC in relazione a un focolaio in Olanda causato da *S. Goldcoast*, il coordinamento nazionale EnterNet ha richiesto al Centro di inviare ad ECDC alcuni genomi di riferimento relativi al focolaio diffusosi in Romagna nel 2018 causato appunto da *S. Goldcoast* (vedi Sezione 1.2.5). L'analisi genomica effettuata dall'ECDC utilizzando lo schema allelico cgMLST sviluppato in Enterobase ha evidenziato che gli stipiti inviati non appartenevano al focolaio olandese sottoposto ad indagine da ECDC.

3.2. Allerte internazionali su *L. monocytogenes*

- ECDC ha diramato un Urgent Inquiry (UI-426) a seguito di un focolaio di 12 casi di *L. monocytogenes* di sierogruppo IIa (ST8) verificatesi in Danimarca, Germania e Francia associato al consumo di salmone (ECDC/EFSA 2018a). L'Operational Contact Point dell'ECDC per listeriosi presso l'ISS ha richiesto al Centro di verificare se ci fossero isolati clinici in Emilia Romagna negli anni 2017 e 2018 con un profilo di cgMLST simile al genoma di riferimento del focolaio (<15 alleli). Tra gli otto stipiti di *L. monocytogenes* ST8 isolati in regione nel periodo di riferimento non sono stati rilevati casi ascrivibili al focolaio.

- Nel luglio 2018, ECDC ed EFSA hanno pubblicato un Joint Rapid Outbreak Assessment su un focolaio multi-stato (EPIS UI-444) di *L. monocytogenes* che ha causato 47 casi (con nove decessi) avente sequence type ST6 e associato al consumo di vegetali congelati (ECDC/EFSA 2018b). Anche in Italia, a seguito del focolaio UI-444, alcuni prodotti surgelati sono stati ritirati dal commercio per la presenza di *L. monocytogenes*. Il coordinamento nazionale EnterNet ha segnalato al nostro Centro questa situazione di emergenza e ha fornito un genoma di riferimento del focolaio UI-444 (denominato FI_122265). Allo scopo di verificare se il focolaio di *L. monocytogenes* ST6 verificatosi in Emilia Romagna (si veda sezione 2.1.3) fosse collegato con il focolaio internazionale UI-444, il Centro ha analizzato i profili cgMLST degli isolati Emiliano-Romagnoli del focolaio 2.1.3 e del genoma di riferimento del focolaio internazionale UI-444 per analizzarne il livello di similarità. Tra i 10 stipiti di *L. monocytogenes* ST6 del focolaio 2.1.3 e il genoma di riferimento del focolaio internazionale UI-444 sono state rilevate differenze alliliche maggiori del cut-off di 7 alleli (28 o più differenze alleliche). Ne segue che il focolaio 2.1.3 dell'Emilia Romagna non è parte del focolaio Europeo UI-444.

Bibliografia

Boxrud D, Wolfgang WJ (2017) The use of whole genome sequencing for surveillance of enteric organisms by United States Public Health laboratories. In X. Deng et al. (eds.), Applied Genomics of Foodborne Pathogens. pp. 33-50. Series: Food Microbiology and Food Safety. Springer International Publishing, Switzerland.

ECDC (2018) Communicable Disease Threats Report. Week 22, 27 May-2 June 2018. Stockholm: ECDC.

ECDC/EFSA (2018a) Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 infections linked to consumption of salmon products – 25 October 2018. Stockholm and Parma: ECDC/EFSA.

ECDC/EFSA (2018b) Joint ECDC-EFSA rapid outbreak assessment. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus sequence type 6, infections linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables – first update. 3 July 2018. Stockholm and Parma: ECDC/EFSA

EFSA/ECDC (2018) The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. EFSA Journal 16(2):5182.

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>.

Morganti M, Bolzoni L, Scaltriti E, Casadei G, Carra E, Rossi L, Gherardi P, Faccini F, Arrigoni N, Sacchi AR, Delle Donne M, Pongolini S (2018) Rise and fall of outbreak-specific clone inside endemic pulsotype of *Salmonella* 4,[5],12:i:- insights from high resolution molecular surveillance in Emilia-Romagna, Italy, 2012-2015. *Eurosurveillance* 23:pil=17-00375.

Moura A, Criscuolo A, Pouseele H, Maury MM, Leclercq A, et al. (2016) Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nature Microbiology* 2:16185.

Rounds JM, Hedberg CW, Meyer S, Boxrud DJ, Smith KE (2007) *Salmonella enterica* pulsed-field gel electrophoresis clusters, Minnesota, USA, 2001–2007. *Emerg Infect Dis* 16(11):1678-85.

Rounds JM, Boxrud DJ, Jawahir SL, Smith KE (2012) Dynamics of *Escherichia coli* O157:H7 outbreak detection and investigation, Minnesota 2000-2008. *Epidemiol Infect* 140(8):1430-8.

Van Walle I, Björkman JT, Cormican M, Dallman T, Mossong J, Moura A, Pietzka A, Ruppitsch W, Takkinen J, European *Listeria* WGS typing group (2018) Retrospective validation of whole genome sequencing-enhanced surveillance of listeriosis in Europe, 2010 to 2015. *Eurosurveillance* 23(33):pii=1700798.

Il report è stato predisposto da:

Bolzoni Luca

Morganti Marina

Scaltriti Erika

Pongolini Stefano

Alla sorveglianza microbiologica contribuiscono:

I Laboratori di Microbiologia Medica della Regione

I Servizi di Igiene e Sanità Pubblica della Regione

I Servizi di Igiene degli Alimenti e della Nutrizione della Regione

I Servizi Veterinari della Regione

Il Servizio Prevenzione Collettiva e Sanità Pubblica dell'Assessorato Politiche per la Salute della Regione

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna

Alle attività del 2018 hanno collaborato:

Il Centro di Riferimento Enternet della Provincia Autonoma di Bolzano

Il Centro di Riferimento Enternet della Regione Marche