



REPORT DELL'ATTIVITÀ DEL CENTRO ENTERNET NELL'ANNO 2019

Giugno 2020

1. Sorveglianza di *Salmonella enterica*

Periodo Gennaio-Dicembre 2019

Il report si riferisce ai 732 stipiti di *Salmonella enterica* isolati dai pazienti della Regione Emilia-Romagna nel periodo gennaio-dicembre 2019 e inviati al Centro di Riferimento Regionale Enternet presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER).

Fig. 1: Isolati per mese di prelievo di *S. enterica* nel periodo 2013- 2019. Tra parentesi il totale degli stipiti isolati per anno.

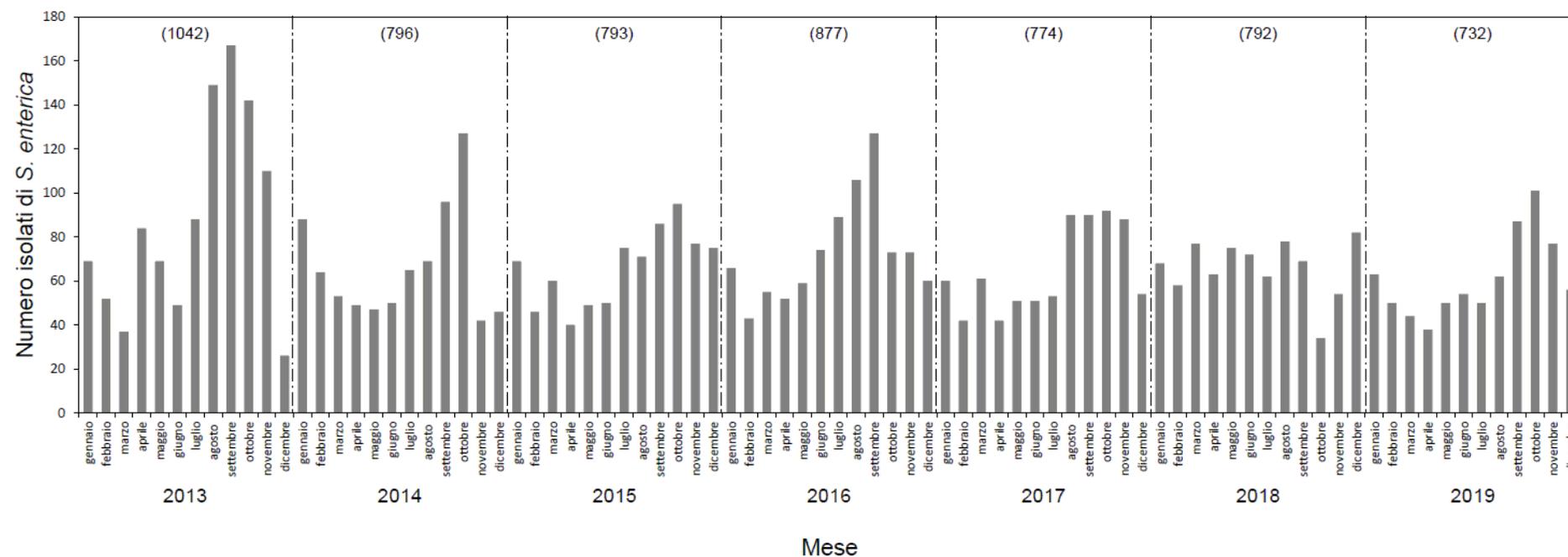


Fig. 2: Percentuale di isolati attribuibili ai principali sierotipi (i.e. >2% degli isolamenti nel periodo) di *Salmonella enterica* negli anni 2014-2019.

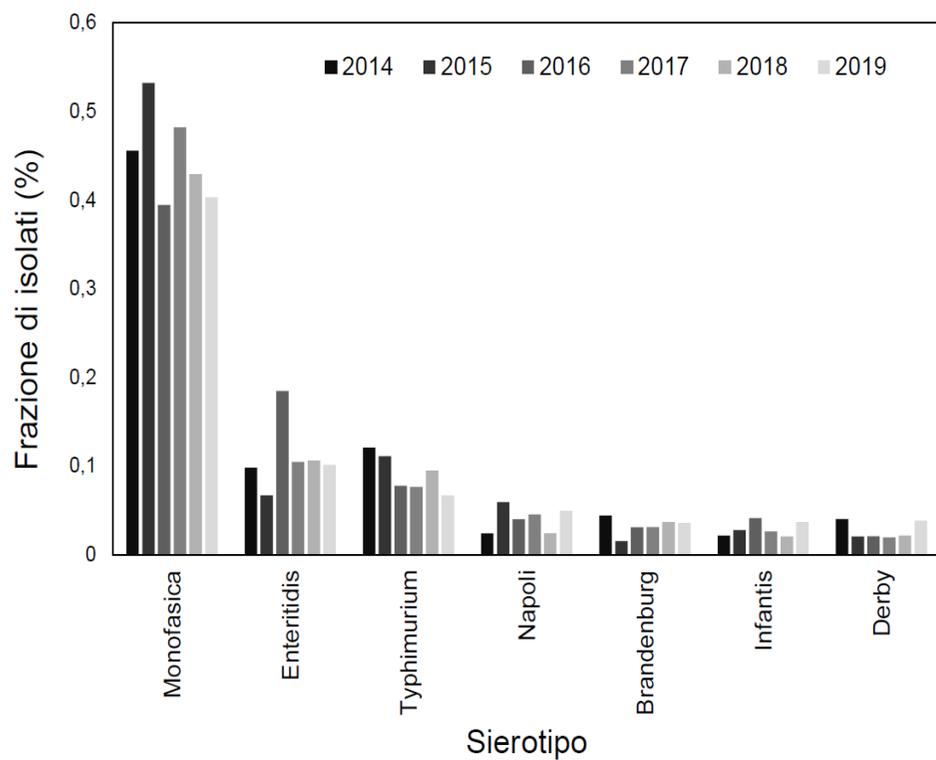
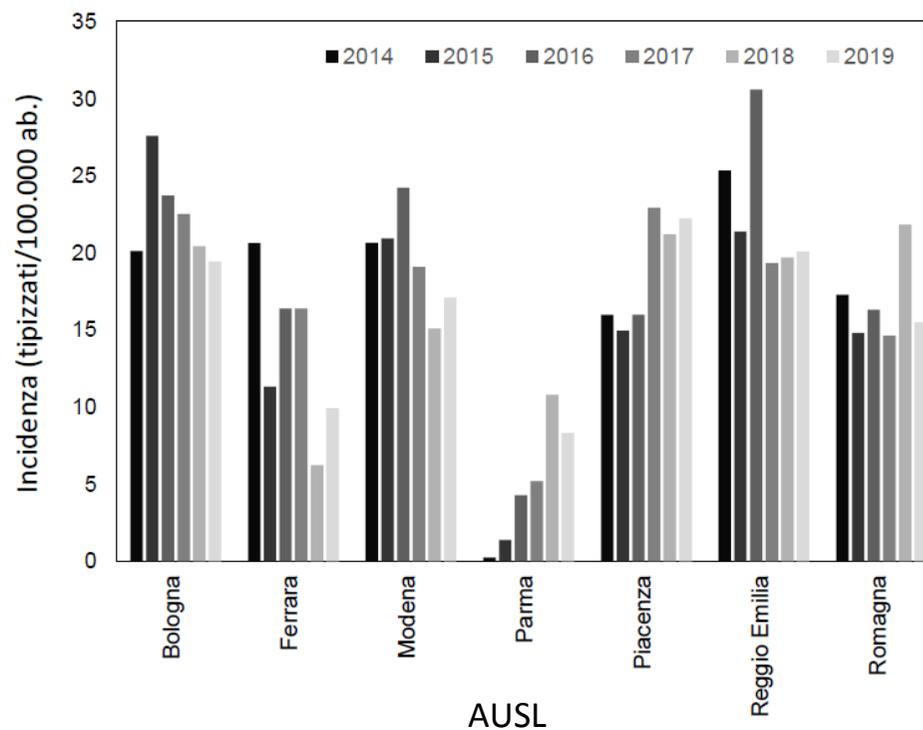


Fig. 3: Isolamento di *Salmonella enterica* per 100.000 abitanti negli anni 2014-2019 in funzione dell'ASL di prelievo.



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 Pulsed-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 utilizziamo 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 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 nel corso degli anni è stato progressivamente affiancato dalla tipizzazione con WGS degli isolati appartenenti al genotipo PFGE che mostra un andamento crescente dei casi. Lo scopo della tipizzazione WGS è quello di identificare gli specifici isolati che presentano un reciproca similarità sufficientemente elevata da essere considerati potenziali membri di uno stesso focolaio. Il sistema si riferisce a questi stipiti come "cluster" di isolati.

1.2 Potenziali focolai diffusi di *Salmonella enterica* rilevati nell'anno 2019

Il sistema di individuazione di potenziali focolai attivo presso il Centro, basato sull'analisi sistematica dei tracciati PFGE degli isolati di *Salmonella enterica* di origine umana e sulla conferma in WGS, ha evidenziato, nell'anno 2019, sette potenziali focolai. A fronte dell'identificazione dei cluster di isolati umani, le analisi di correlazione molecolare vengono estese anche agli isolati alimentari e animali routinariamente ricevuti da IZSLER o specificamente associati ai focolai. Per i sierotipi Typhimurium ed Enteritidis, le indagini molecolari si avvalgono anche dei profili MLVA prodotti presso la Sede territoriale di Modena di IZLSER. In due occasioni la segnalazione ai servizi sanitari è avvenuta non a seguito dell'identificazione di cluster di casi umani ma per la rilevata corrispondenza molecolare di casi alimentari a casi umani.

Tab. 1: Riepilogo delle informazioni relative ai sette cluster di salmonellosi segnalati al sistema sanitario. In tabella è riportato il numero di casi presumibilmente attribuibili al focolaio sulla base della sorveglianza molecolare. La colonna AD intrafocolaio riporta la differenza allelica (AD) esistente tra gli isolati confrontati a copie; per ciascun cluster vengono indicati il valore di AD minimo, massimo e mediano (in parentesi). La AD è determinata secondo lo schema Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/senterica>).

| Cluster ID | Casi | Periodo | AUSL Coinvolte | Isolati della catena alimentare coinvolti | Sierotipo | AD intrafocolaio min – max (mediana) |
|-------------------------------|------|-------------------|-----------------|---|-------------|--------------------------------------|
| OB_2019_003 | 9 | lug '19 – set '19 | PC | 1 | Monofasica | 0-2(0) |
| OB_2019_004 | 11 | lug '19 – set '19 | FE, IM, PC, ROM | - | Monofasica | 0-1(0) |
| OB_2019_005 [#] | 1/2* | ago '19 | BO, MO | 6/14* | Enteritidis | -/0-0(0)* |
| OB_2019_CGS_0071 | 22 | set '19 – nov '19 | FE, MO, PR, ROM | 2 | Enteritidis | 0-6(1) |
| OB_2019_CGS_0072 | 12 | ott '18 – nov '19 | BO, FE, RE, ROM | 3 | Monofasica | 0-9(3) |
| OB_2019_CGS_0076 [#] | 2 | nov '19 | RE | 1 | Monofasica | 0-0(0) |
| OB_2019_CGS_0079 | 9 | giu '18 – ott '19 | BO, MO, RE, ROM | 3 | Enteritidis | 0-6(3) |

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

[#] Segnalazione a seguito di rilevata corrispondenza molecolare di casi alimentari a casi umani

2. Sorveglianza su *Listeria monocytogenes*

Periodo Gennaio-Dicembre 2019

Il report si riferisce ai 42 stipiti di *Listeria monocytogenes* isolati dai pazienti della Regione Emilia-Romagna nel periodo gennaio-dicembre 2019 e inviati al Centro di Riferimento Regionale EnterNet presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER).

La Fig. 4 mostra l'andamento nel tempo su base annua degli isolamenti di *Listeria monocytogenes* in regione Emilia Romagna nel periodo 2013-2019. A partire dagli ultimi mesi del 2017 il Centro di Riferimento Regionale EnterNet Emilia-Romagna svolge anche attività di sorveglianza su *L. monocytogenes* basata su 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.

Si sottolinea che 19 dei 42 isolati di *L. monocytogenes* del 2019 appartengono a cluster genomici (45% degli isolati). Questo indica che una proporzione rilevante dei casi di listeriosi non è di natura sporadica ma appartiene verosimilmente a focolai di infezione, confermando quanto osservato lo scorso anno. Inoltre, tutti i quattro cluster con almeno 4 casi hanno visto isolamenti in più di una ASL, fino ad un massimo di 5 diverse ASL per OB_2019_002 (Tab. 2), confermando la tendenza all'ampia distribuzione territoriale di questi focolai e la loro conseguente difficoltà di individuazione in assenza di tecniche di tipizzazione genomica avanzate. Questo è maggiormente vero se si considera anche la loro lunga durata, spesso estesa su più anni (Tab. 2).

Fig. 4: Isolati di *L. monocytogenes* per anno di prelievo nel periodo 2013-2019. In parentesi il totale degli stipiti isolati per anno.

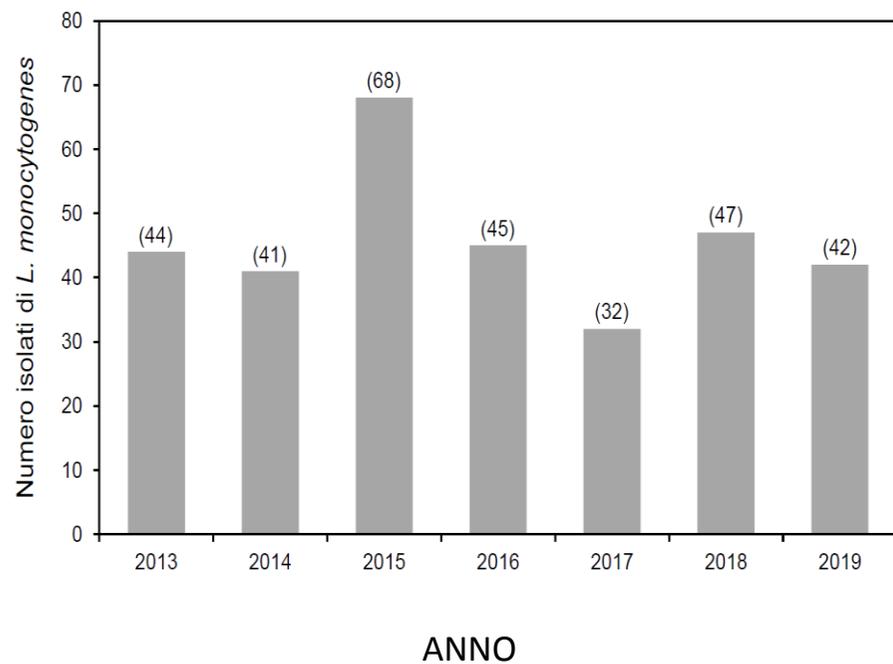


Fig. 5: Isolamento di *Listeria monocytogenes* per 100.000 abitanti negli anni 2014-2019 in funzione dell'ASL di prelievo.

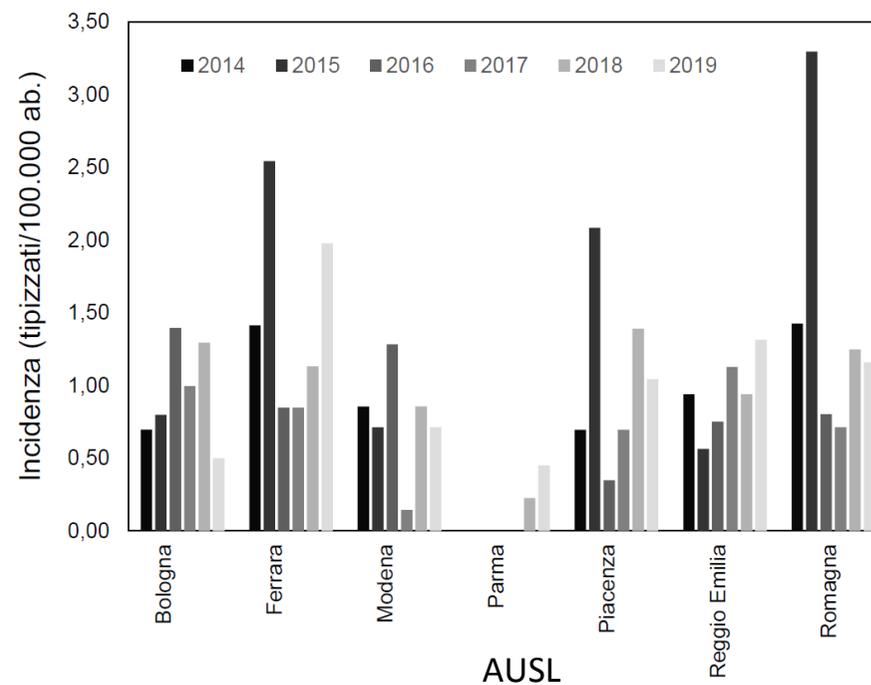


Fig. 6 Distribuzione dei sequencetype (ST) di 333 *L. monocytogenes* isolate da infezioni umane negli anni 2012-2019.

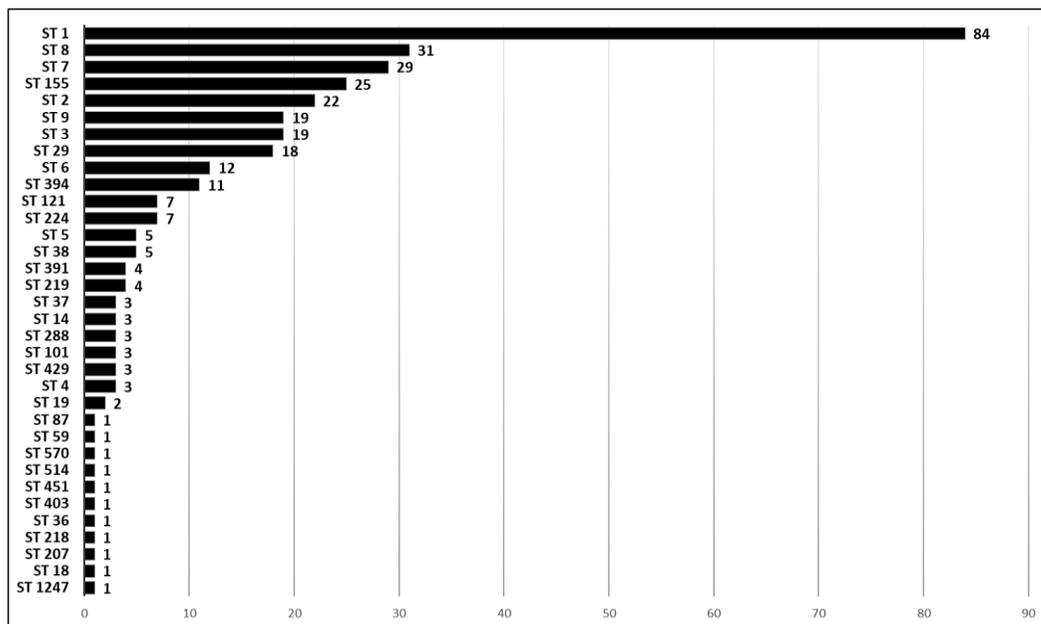
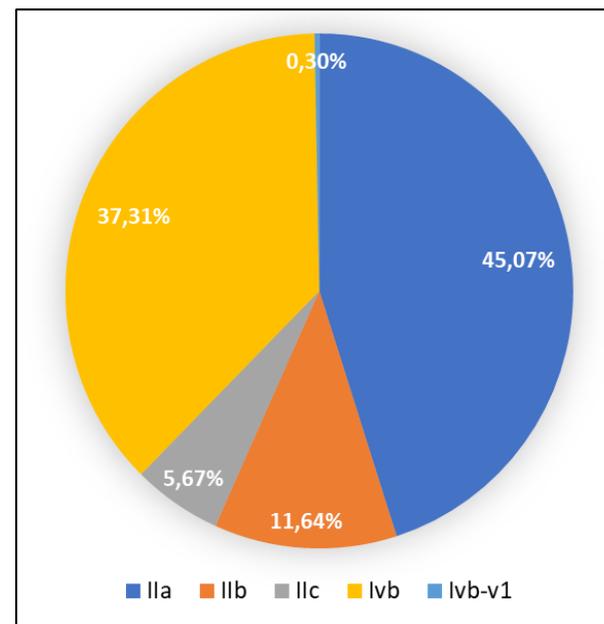


Fig. 7 Sierogruppi di *L. monocytogenes* isolate da infezioni umane negli anni 2012-2019.



2.1 Potenziali focolai diffusi di *Listeria monocytogenes* rilevati nell'anno 2019

A seguito delle indagini molecolari eseguite presso il Centro sugli isolati di *Listeria monocytogenes* di origine umana sono stati evidenziati, nell'anno 2019, sei potenziali focolai, segnalati ai servizi sanitari. In due occasioni la segnalazione ai servizi sanitari è avvenuta non a seguito dell'identificazione di cluster di casi umani ma per la rilevata corrispondenza molecolare di casi alimentari a casi umani.

Tab. 2: Riepilogo delle informazioni relative ai sette cluster di listeriosi segnalati al sistema sanitario. In tabella è riportato il numero di casi presumibilmente attribuibili al focolaio sulla base della sorveglianza molecolare. La colonna AD intrafocolaio riporta la differenza allelica (AD) esistente tra gli isolati confrontati a copie; per ciascun cluster vengono indicati il valore di AD minimo, quello massimo e il valore mediano. La AD è determinata secondo lo schema di Moura et al. 2016.

| Cluster ID | Casi | Periodo | AUSL Coinvolte | Sequence Type | Isolati della catena alimentare coinvolti | AD intrafocolaio min – max (mediana) |
|-------------------------------|------|-------------------|---------------------|---------------|---|--------------------------------------|
| OB_2019_001 [#] | 2 | ott '14 – giu '18 | ROM | 121 | 7 | 2-2(2) |
| OB_2019_002 | 8 | feb '14 – set '19 | ROM, RE, MO, BO, FE | 8 | - | 0-7(2) |
| OB_2019_006 | 4 | ago '15 – lug '19 | ROM, RE, PC, FE | 8 | - | 0-6(3) |
| OB_2019_007 | 4 | giu '14 – ago '19 | FE, PC | 155 | - | 0-4(3) |
| OB_2019_CGL_0008 [#] | 2 | set '18 – nov '18 | FE | 8 | 1 | 5-5(5) |
| OB_2019_CGL_0029 | 10 | mar '13 – set '19 | ROM, RE, PC, MO | 155 | - | 0-8(4) |

[#] Segnalazione a seguito di rilevata corrispondenza molecolare di casi alimentari a casi umani

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 delle malattie a trasmissione alimentare. In questo contesto, il centro riceve allerte e richieste di informazioni in relazione alla 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 delle metodologie epidemiologico-molecolari, in particolare il WGS, è possibile accertare se stipiti batterici 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 dei focolai in questione.

Nell'anno 2019 il Centro ha fornito informazioni per le indagini relative a 10 allerte su *Salmonella enterica* e 6 allerta su *Listeria monocytogenes*.

Tab. 3: Allerte e richieste di informazioni nazionali e internazionali relative a *Salmonella enterica* per le quali il Centro ha fornito informazioni

| Richiedente | Codice Segnalazione | Oggetto | Data | Corrispondenza |
|---|------------------------------------|---|------------|------------------------------|
| ISS | UI537 | Multi-country outbreak di <i>S. Poona</i> legato a latte per infanzia (agosto 2018 - febbraio 2019) | 19/03/2019 | non rilevata |
| ISS | / | Outbreak di <i>S. Typhimurium</i> var. monofasica MLVA 3-10-9-NA-211 (marzo 2019 - aprile 2019) | 15/04/2019 | non rilevata - rilevata 2020 |
| ISS | N19-0258_CH | Outbreak di <i>S. Derby</i> - CH (gennaio 2019 - febbraio 2019) | 19/04/2019 | non rilevata |
| ISS | / | Aumento casi <i>S. Havana</i> (gennaio 2019 - marzo 2019) | 23/05/2019 | non rilevata |
| ISS | / | Aumento casi <i>S. Hadar</i> (aprile 2019 - maggio 2019) | 23/05/2019 | non rilevata |
| Ministero Salute | 0000101-02/01/2019-DGPRES-DGPRES-P | Allerta <i>S. Typhi</i> XDR aplotipo H58 (XDR) | 24/10/2019 | rilevata |
| https://www.ecdc.europa.eu/en/threats-and-outbreaks/reports-and-data/weekly-threats | / | Outbreak di <i>S. Enteritidis</i> crociera UK (maggio 2019) | 16/07/2019 | non rilevata |
| https://www.foodsafetynews.com/ | / | Aumento casi <i>S. Mikawasima</i> | 20/11/2019 | non rilevata |
| ISS | / | Outbreak di <i>S. enteritidis</i> legato al consumo di uova - PL | 05/11/2019 | rilevata |
| Ministero Salute | RASFF 2019.3851 | Outbreak di <i>S. bovismorbificans</i> - DE | 25/11/2019 | non rilevata |

Tab. 4: Allerte e richieste di informazioni nazionali e internazionali relative a *Listeria monocytogenes*.

| Segnalante | Codice segnalazione | Oggetto | Data | Corrispondenza |
|-----------------------|--|---|------------|----------------|
| ISS | EPIS-UI545 | Outbreak di L. mono. CT2521 - DE | 03/12/2018 | non rilevata |
| EFSA | EFSA Supporting publication 2019:EN-1665 | Outbreak di L. mono. CC8-ST1247 - DK, EE, FI, SE, FR (2014-2019) | 05/06/2019 | rilevata |
| ISS | EPIS-UI490 | Outbreak di L. mono. ST 32 | 19/09/2019 | non rilevata |
| ISS | EPIS-UI492 | Outbreak di L. mono. ST8 UI492 | 19/09/2019 | non rilevata |
| ISS | / | Outbreak di L. mono. ST5 | 14/10/2019 | non rilevata |
| Focal Point Naz. EFSA | UI583 | Multi-country outbreak di L. mono. ST6 legato a prodotti a base di carne ready to eat | 09/12/2019 | non rilevata |

Bibliografia

EFSA/ECDC (2018) The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA Journal* 2020;18(3):6007.

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:pii=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

Menziozzi Ilaria

Morganti Marina

Scaltriti Erika

Soliani Laura

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