

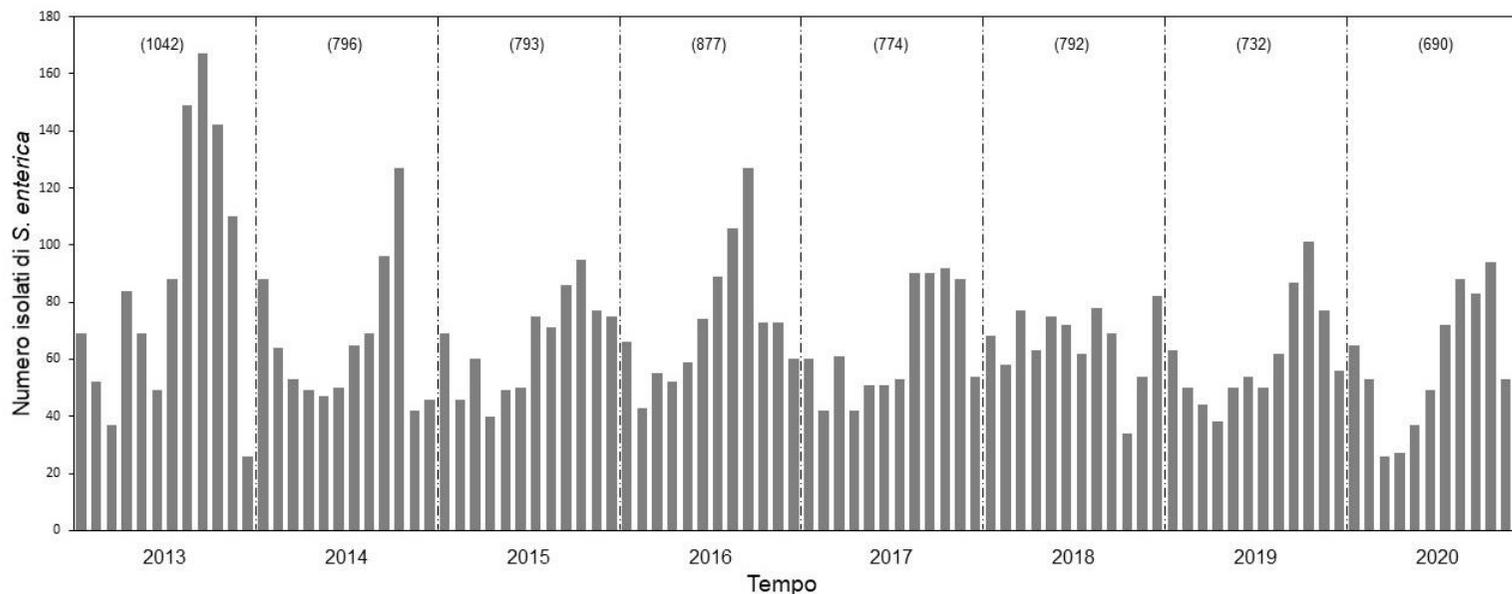


REPORT DELL'ATTIVITÀ DEL CENTRO ENTENET NELL'ANNO 2020

Agosto 2021

## 1. Sorveglianza su *Salmonella enterica*

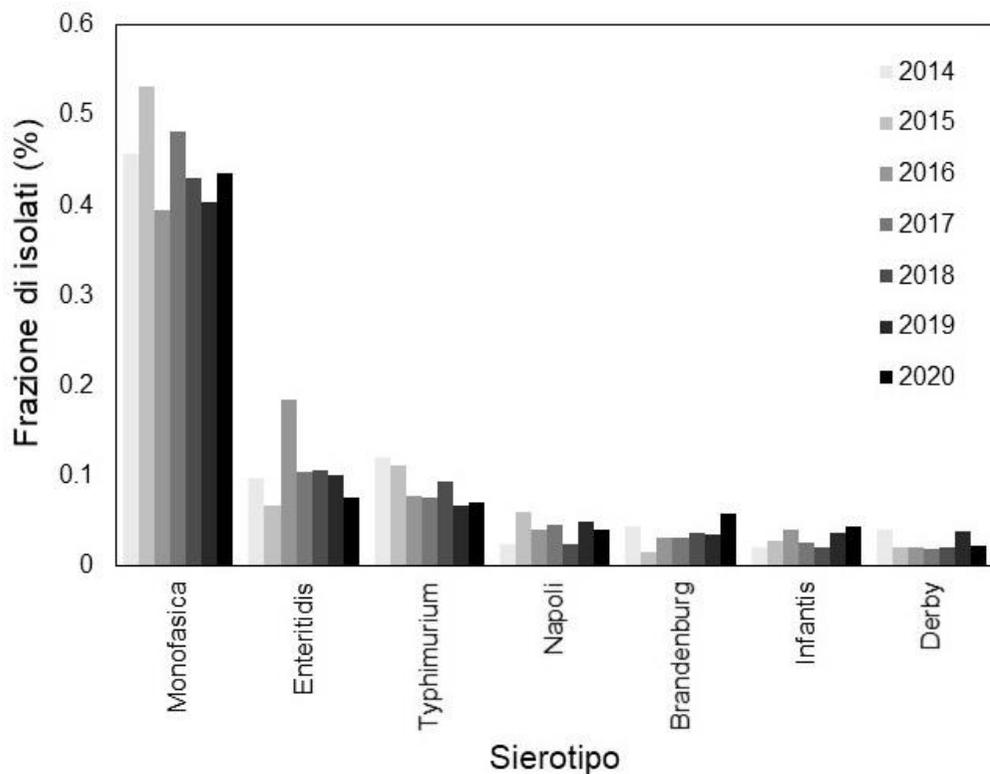
Fig. 1: Isolati per mese di prelievo di *S. enterica* nel periodo 2013- 2020. Tra parentesi il totale degli stipiti isolati per anno.



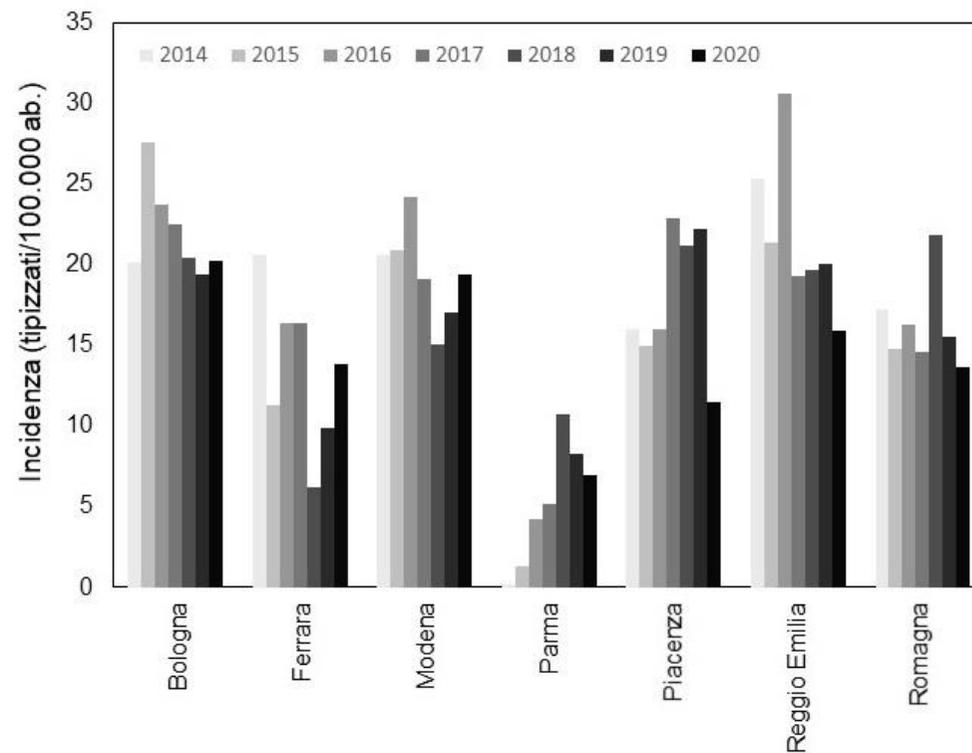
### Periodo Gennaio-Dicembre 2020

Il report si riferisce ai 690 stipiti di *Salmonella enterica* isolati dai pazienti della Regione Emilia-Romagna nel periodo gennaio-dicembre 2020 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 2014-2020.



**Fig. 3:** Isolamento di *Salmonella enterica* per 100.000 abitanti negli anni 2014-2020 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 EnterNet 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 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 indentificare gli specifici isolati che presentano una reciproca similarità sufficientemente elevata da essere considerati potenziali membri di uno stesso focolaio. Il sistema si riferisce a questi stipiti come "cluster" di isolati.

A partire dal gennaio 2020, tutti gli stipiti isolati da casi umani o da catena alimentare di *S. enterica* conferiti al Centro e appartenenti ai principali sierotipi dal punto di vista della sanità pubblica (Typhimurium e sua variante Monofasica, Enteritidis, Brandenburg e Typhi), a sierotipi legati ad allerte nazionali e/o internazionali (Blockley, Bovismorbificans e Strathcona) o a sierotipi per cui la PFGE non garantisce sufficiente potere discriminante (Coeln e Goldcoast) sono tipizzati in WGS.

### 1.2 Potenziali focolai diffusi di *Salmonella enterica* rilevati nell'anno 2020

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 2020, 19 cluster genomici indicativi di altrettanti 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.

**Tab. 1:** Riepilogo delle informazioni relative ai cluster di salmonellosi segnalati al sistema sanitario. In tabella è riportato il numero di casi attribuibili al cluster sulla base della sorveglianza molecolare. L'ultima colonna riporta la differenza allelica (AD) pairwise calcolata tra gli isolati del cluster. La AD è determinata secondo lo schema Enterobase.

Cluster ID	Casi	Periodo	AUSL Coinvolte	Isolati della catena alimentare coinvolti	Sierotipo	AD min - max (mediana)
OB_2020_GCS_0090	81	Gen - dic '20	Tutte	4	Monofasica	0-14(4)
OB_2020_GCS_0099	9	Feb - mar '20	BO, ROM	1	Monofasica	0-1(0)
OB_2020_GCS_0102	11	Apr - giu '20	IM, ROM	1	Monofasica	0-5(2)
OB_2020_GCS_0108	4	Giu - set '20	BO	1	Goldcoast	0-0(0)
OB_2020_GCS_0110	4	Mag - set '20	RE, MO	-	Monofasica	0-2(1)
OB_2020_GCS_0120	4	Giu - lug '20	MO, IM	1	Monofasica	0-0(0)
OB_2020_GCS_0122	3	Giu '20	PC, MO, RE	2	London	0-0(0)
OB_2020_GCS_0123	6	Lug - dic '20	PC, BO, RE	1	Monofasica	0-2(1)
OB_2020_GCS_0125	7	Ago - Ott '20	PC, RE, FE, ROM	1	Enteritidis	0-3(0)
OB_2020_GCS_0127	4	Giu - ago '20	MO, IM, ROM	-	Brandenburg	0-2(1)
OB_2020_GCS_0128	9	Gen - dic '20	PC, PR, RE, MO, ROM	8	Blockley	0-9(3)
OB_2020_GCS_0130	4	Ott '18 - ago '20	PC, PR, RE, MO	20	Typhimurium	0-7(2)
2020_GCS_0131	6	Feb - set '20	PC, BO, ROM	12	Typhimurium	0-13(5)
2020_GCS_0132	8	Gen - nov '20	PC, RE, MO	1	Bovismorbificans	0-2(0)
2020_GCS_0139	22	Ago - dic '20	PC, PR, RE, MO, BO	-	London	0-4(0)
2020_GCS_0141	3	Apr - ott '20	BO, ROM	1	Brandenburg	0-2(1)
2020_GCS_0143	5	Ott '20	PC, PR, RE, MO	-	Hadar	0-1(0)
2020_GCS_0145	7	Ott - dic '20	BO, ROM	1	Monofasica	0-3(1)
2020_GCS_0146	3	Set - ott '20	RE, MO	1	Enteritidis	0-2(1)

## 2. Sorveglianza su *Listeria monocytogenes*

### Periodo Gennaio-Dicembre 2020

Il report si riferisce ai 26 stipti di *Listeria monocytogenes* isolati dai pazienti della Regione Emilia-Romagna nel periodo gennaio-dicembre 2020 e inviati al Centro di Riferimento Regionale Enternet presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER).

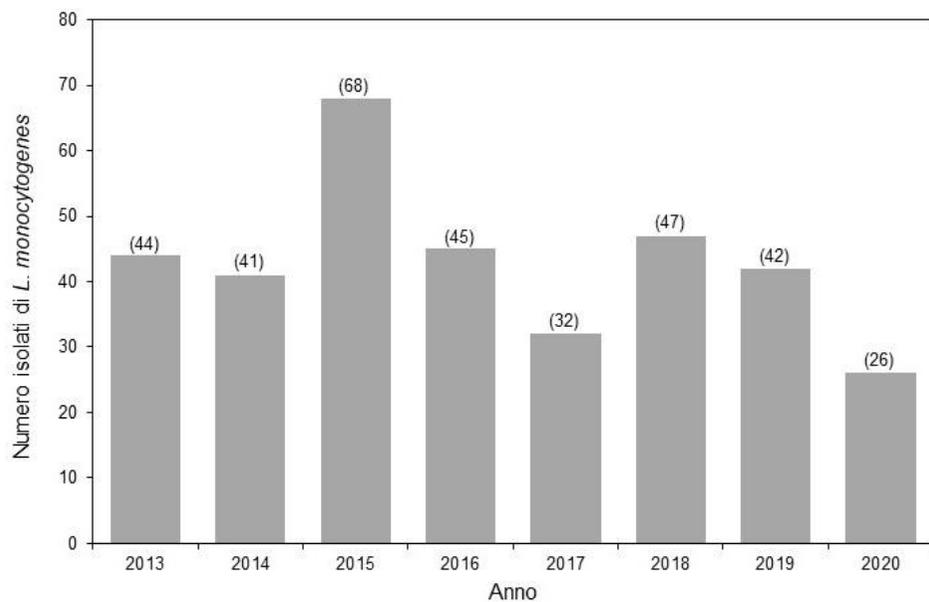
La Fig. 4 mostra l'andamento nel tempo su base annua degli isolamenti di *Listeria monocytogenes* in regione Emilia Romagna nel periodo 2013-2020. A partire dagli ultimi mesi del 2017 il Centro di Riferimento Regionale Enternet Emilia-Romagna svolge anche attività di sorveglianza su *L. monocytogenes* 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

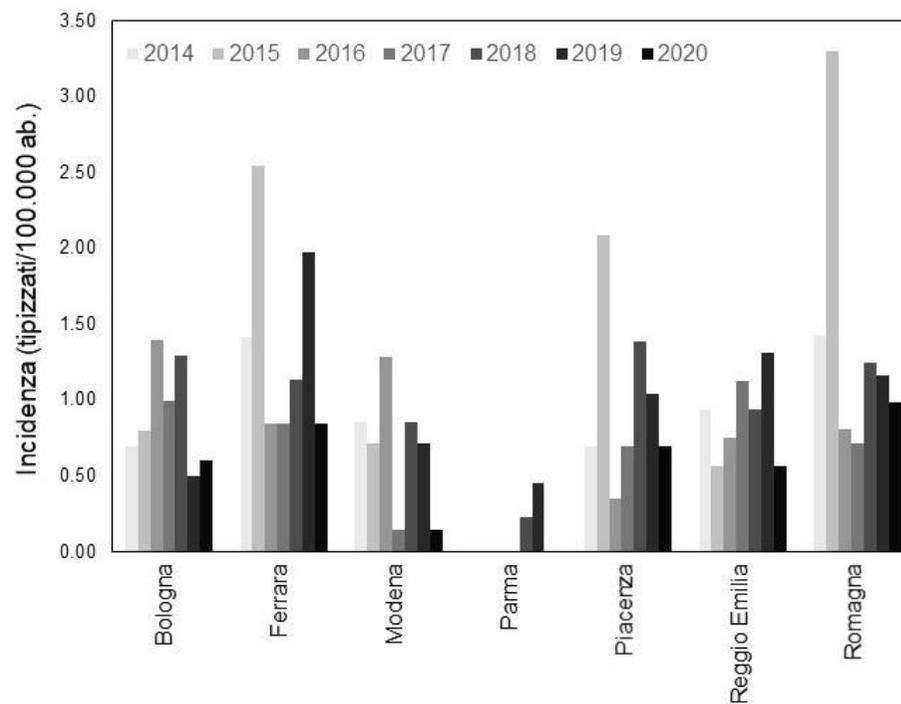
con quattro o più casi porta con maggior probabilità all'identificazione della sorgente di infezione rispetto a cluster più piccoli (Rounds et al. 2007; Rounds et al. 2012). Coerentemente con questi risultati il Centro segnala al Servizio Sanitario Regionale la presenza di potenziali focolai di *L. monocytogenes* 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 17 dei 26 isolati di *L. monocytogenes* del 2020 appartengono a cluster genomici (65% 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 gli anni precedenti.

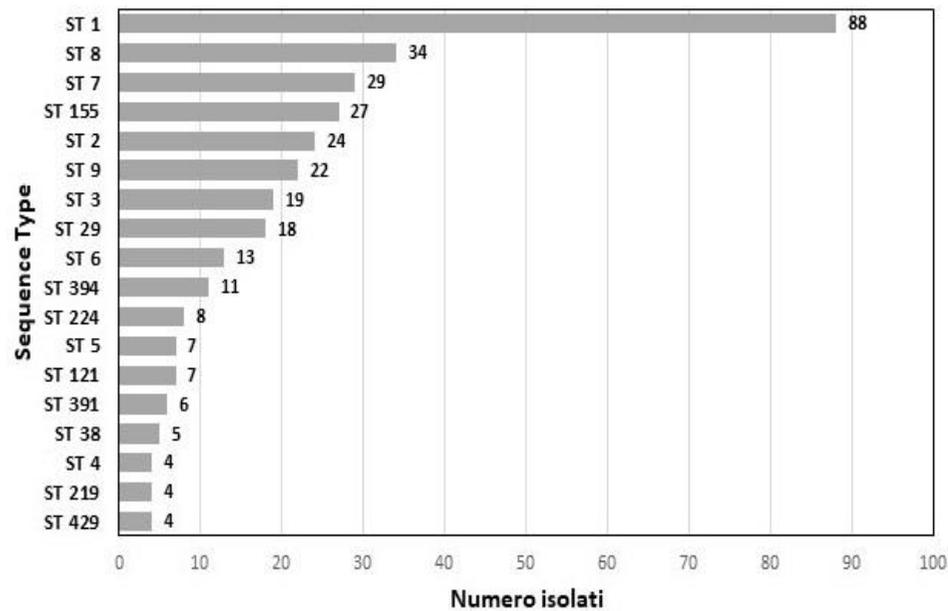
**Fig. 4:** Isolati di *L. monocytogenes* per anno di prelievo nel periodo 2013-2020. In parentesi il totale degli stipiti isolati per anno.



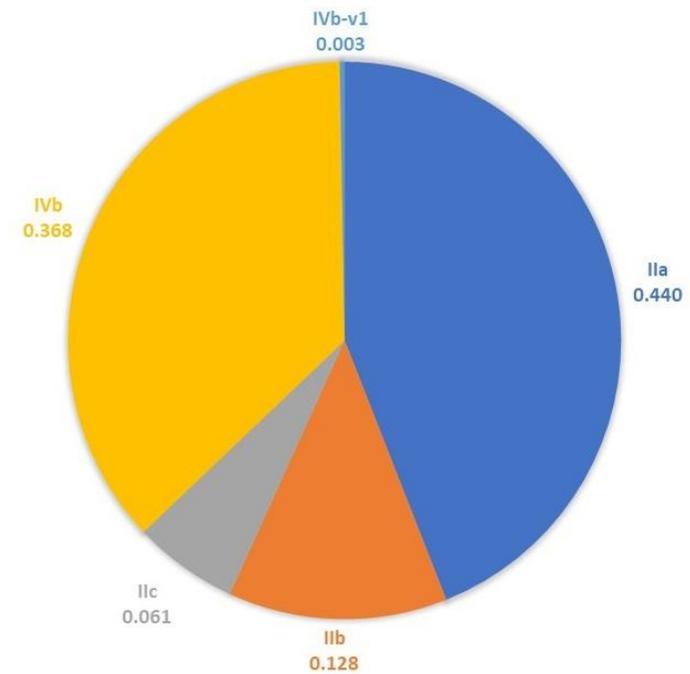
**Fig. 5:** Isolamento di *Listeria monocytogenes* per 100.000 abitanti negli anni 2014-2020 in funzione dell'ASL di prelievo.



**Fig. 6:** Distribuzione dei principali (>1%) sequence type (ST) di *L. monocytogenes* isolati da infezioni umane negli anni 2012-2020.



**Fig. 7:** Sierogruppi di *L. monocytogenes* isolate da infezioni umane negli anni 2012-2020.



## 2.1 Potenziali focolai diffusi di *L. monocytogenes* rilevati nell'anno 2020

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 2020, tre potenziali focolai relativi a isolamenti analizzati in tempo utile per procedere ad allerte sanitarie. 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.

**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_2020_GCL_0051	1	giu '20	ROM	429	2	0-1(1)
OB_2020_GCL_0066	5	nov '19 - mar '20	ROM, RE, BO	2	-	0-2(2)
OB_2020_GCL_0085	1 <sup>#</sup>	giu '20	ROM	9	1	6

<sup>#</sup>Caso associato per via genomica a focolaio di listeriosi europeo multi-country legato al consumo di salmone

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

Il Centro di Riferimento Regionale Enteric 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 2020 il Centro ha fornito informazioni per le indagini relative a 5 allerte su *Salmonella enterica* e 2 allerte 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	UI-620	Outbreak di <i>S. Enteritidis</i> in Francia	13/01/2020	Rilevata
ISS	UI-630	Outbreak di <i>L. monocytogenes</i> da salmone in Germania	09/03/2020	Rilevata
ISS	UI-632	Outbreak di <i>L. monocytogenes</i> da salmone in Germania	09/03/2020	Non rilevata
ISS	/	Outbreak di <i>S. Enteritidis</i> in Germania	24/05/2020	Non rilevata
ROA ECDC/EFSA	/	Outbreak di <i>S. Typhimurium</i> in Germania	07/09/2020	Rilevata nel 2021
ISS	/	Outbreak di <i>S. Strathcona</i> in Europa	14/10/2020	Rilevata
RASFF	/	Outbreak di <i>S. Monofasica</i> in Francia	23/10/2020	Non rilevata

## 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>.

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.

**Il report è stato predisposto da:**

Bolzoni Luca

Bracchi Chiara

Dodi Alessandra

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