

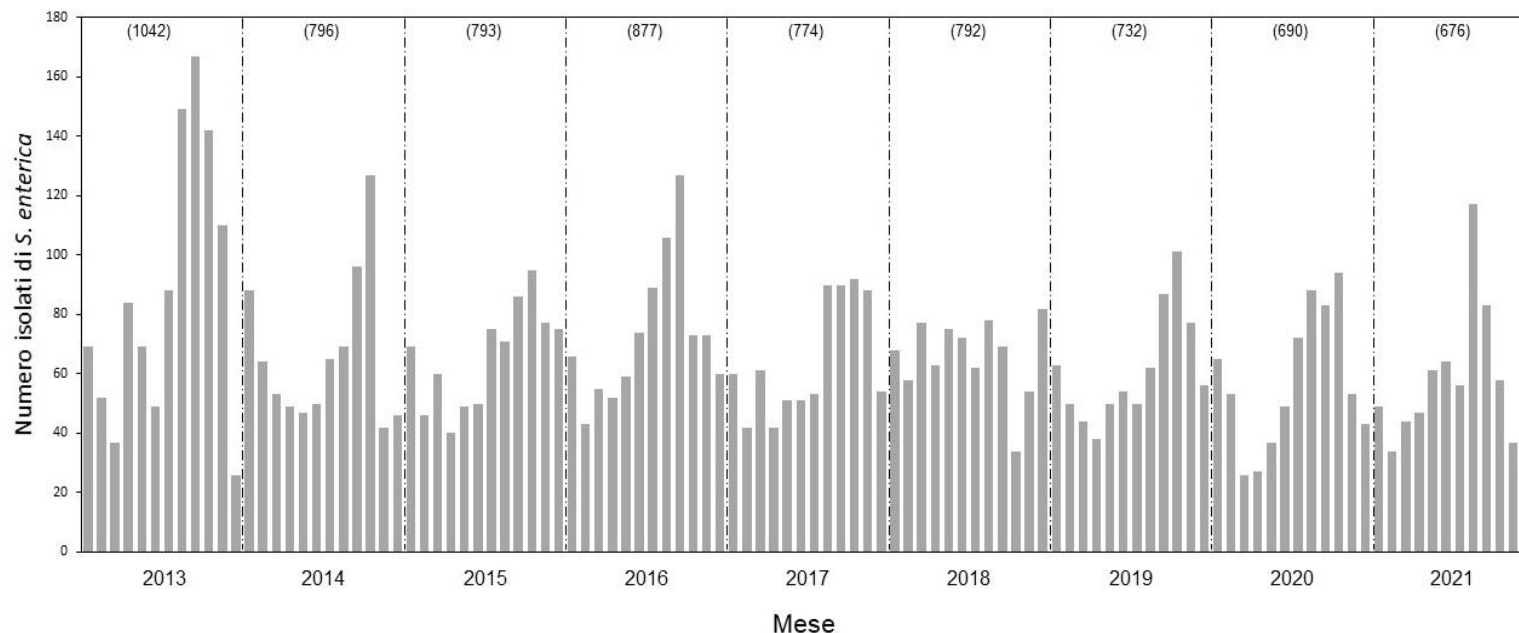


REPORT DELL'ATTIVITÀ DEL CENTRO ENTERNET NELL'ANNO 2021

Luglio 2022

1. Sorveglianza su *Salmonella enterica*

Fig. 1: Isolati per mese di prelievo di *S. enterica* nel periodo 2013- 2021. Tra parentesi il totale degli stipti isolati per anno.



Periodo Gennaio-Dicembre 2021

Il report si riferisce ai 676 stipti di *Salmonella enterica* isolati dai pazienti della Regione Emilia-Romagna nel periodo gennaio-dicembre 2021 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 2014-2021.

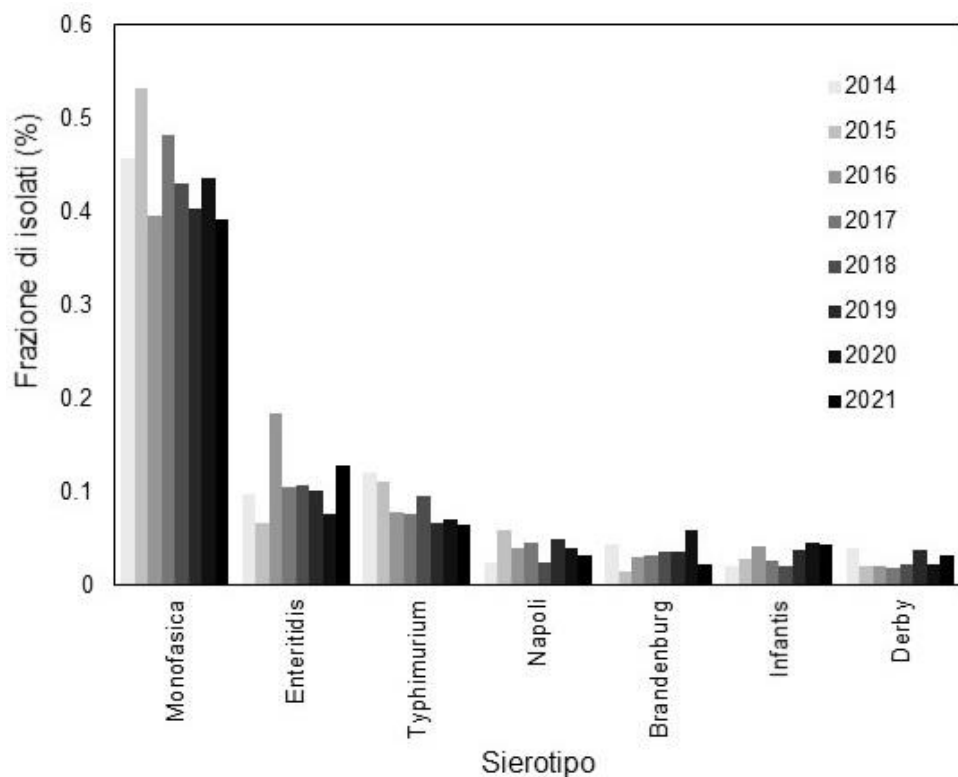
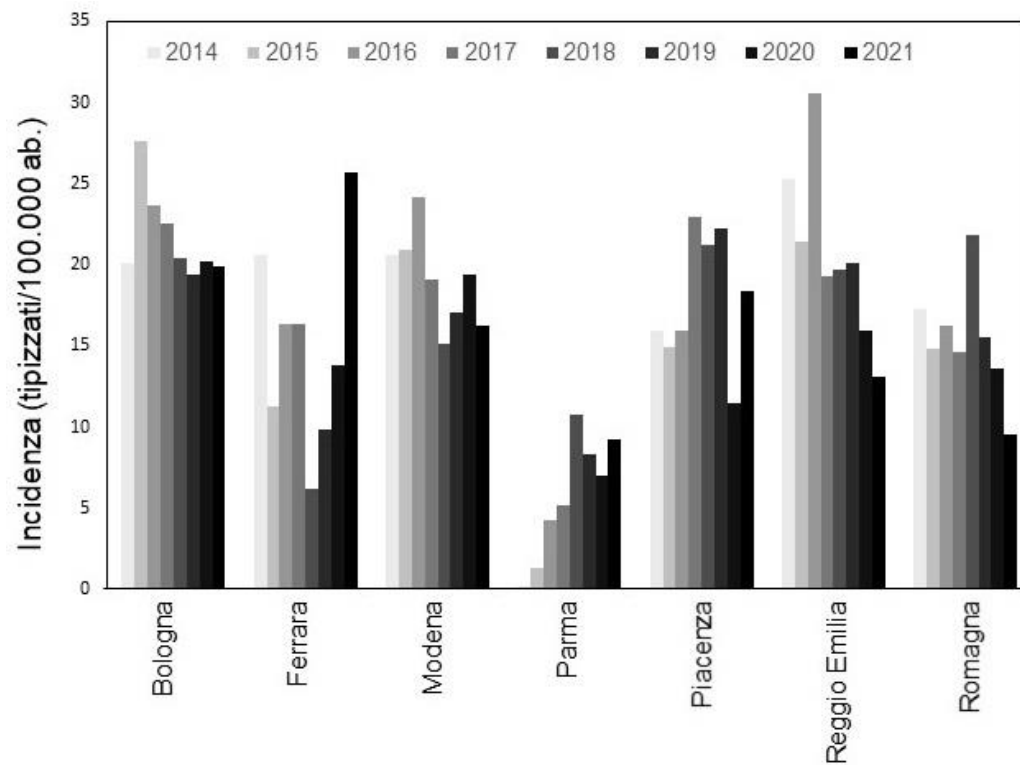


Fig. 3: Isolamento di *Salmonella enterica* per 100.000 abitanti negli anni 2014-2021 in funzione dell'ASL di prelievo.



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 genotipizzati attraverso diverse tecniche che ne permettono una più fine caratterizzazione utilizzabile a scopo epidemiologico.

La Fig. 1 mostra l'andamento nel tempo su base mensile degli isolamenti di *Salmonella enterica* in regione Emilia-Romagna nel periodo 2013-2021. 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 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. Tale sorveglianza è diventata sistematica nel gennaio 2021 per gli stipiti di tutti i sierotipi di *S. enterica*. Lo scopo della tipizzazione WGS è quello di identificare 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. 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 3000 geni di *S. enterica* precedentemente validati (Alikhan et al. 2018). La letteratura scientifica su cgMLST di *S. enterica* suggerisce l'utilizzo di un cut-off di massimo 5 mismatch allelici per la definizione dei cluster genomici

(equivalente a una similarità minima del 99.83% tra genomi, ECDC & EFSA et al. 2021).

2) Nel caso il cgMLST identifichi cluster genomici che possono costituire un potenziale focolaio, indagini supplementari vengono effettuate con un'analisi di SNPs (che rappresenta una metodologia più potente nel discriminare l'appartenenza o meno di un genoma a un cluster rispetto a cgMLST) per la conferma del cluster.

I tre criteri adottati per la conferma in SNPs del cluster genomico sono i seguenti:

(i) esistenza di un gruppo monofiletico di genomi identificato sulla base dell'analisi dei core SNPs;

(ii) tale gruppo deve essere caratterizzato da alto supporto della *bootstrap analysis* (>90%);

(iii) i genomi appartenenti al gruppo devono avere distanza massima di 5 SNPs in *single-linkage clustering*.

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 *S. enterica* quando in un periodo di 2 mesi: i) individua cluster genomici (con similarità >99.83%) di 4 o più casi umani; ii) individua cluster genomici di 2 o più casi umani e uno o più isolati alimentari.

1.2 Potenziali focolai diffusi di *Salmonella enterica* rilevati nell'anno 2021

Nell'anno 2021, il sistema di individuazione di potenziali focolai attivo presso il Centro, basato sull'analisi sistematica degli isolati di *Salmonella enterica* di origine umana in WGS, ha evidenziato 18 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) in single linkage calcolata tra gli isolati del cluster secondo lo schema Enterobase.

Cluster ID	Casi	Periodo	AUSL Coinvolte	Isolati della catena alimentare coinvolti	Sierotipo	AD
2021_GCS_0118	11	Apr '20 - giu '21	BO, FE, ROM	2	Monofasica	4
2021_GCS_0138	13	Ago - dic '21	BO, PC, ROM	-	Strathcona	2
2021_GCS_0148	4	Apr - giu '21	IM, ROM	1	Monofasica	2
2021_GCS_0149	67	Apr - dic '21	BO, FE, MO, PR	6	Monofasica	4
2021_GCS_0167	8	Mar - ago '21	PC, RE	-	Give	4
2021_GCS_0178	2	Apr - mag '21	RO	2	Monofasica	2
2021_GCS_0181	4	Gen - mar '21	FE, RO	-	Rissen	2
2021_GCS_0196	8	Set '20 - Mag '21	FE, RO	-	Monofasica	3
2021_GCS_0197	18	Mag - ago '21	PC, PR, RE	1	Enteritidis	3
2021_GCS_0223	3	Set - nov '21	BO, PR	8	Agona	4
2021_GCS_0224	7	Set '20 - Set '21	PR	3	Enteritidis	2
2021_GCS_0226	8	Giu - Ago '21	BO	-	Monofasica	2
2021_GCS_0232	5	Ago - ott '21	MO, RE, RO	-	Typhimurium	3
2021_GCS_0249	4	Lug - ago '21	MO	-	Enteritidis	2
2021_GCS_0251	13	Set - dic '21	MO, PR	23	Monofasica	1
2021_GCS_0256	8	Ott - dic '21	BO, RO	11	Rissen	2
2021_GCS_0259	4	Ott '21	BO, MO	-	Monofasica	3
2021_GCS_0266	5	Nov - dic '21	MO	-	Poona	1

2. Sorveglianza su *Listeria monocytogenes*

Periodo Gennaio-Dicembre 2021

Il report si riferisce ai 39 stipti di *Listeria monocytogenes* isolati dai pazienti della Regione Emilia-Romagna nel periodo gennaio-dicembre 2021 e inviati al Centro di Riferimento Regionale Enteric 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 2013-2021. 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 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 4 mismatch allelici per la definizione dei cluster genomici (equivalente a una similarità minima del 99.77% 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 anche 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 in un periodo di 2 anni: i) individua cluster genomici (con similarità >99.77%) di 4 o più casi umani; ii) individua cluster genomici di 2 o più casi umani e uno o più isolati alimentari.

Si sottolinea che 21 dei 39 isolati di *L. monocytogenes* del 2021 appartengono a cluster genomici (54% 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 2013-2021. In parentesi il totale degli stipiti isolati per anno.

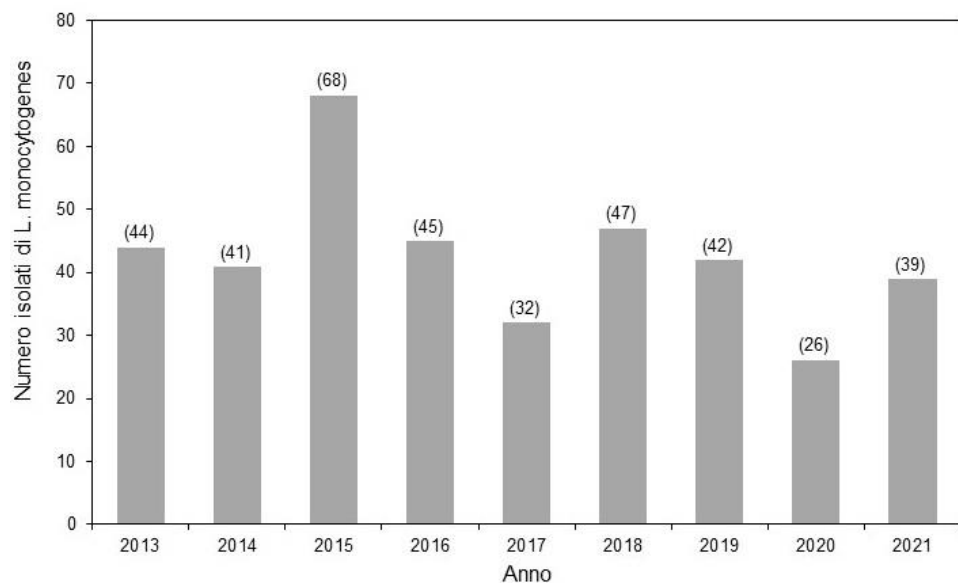


Fig. 5: Isolamento di *Listeria monocytogenes* per 100.000 abitanti negli anni 2014-2021 in funzione dell'ASL di prelievo.

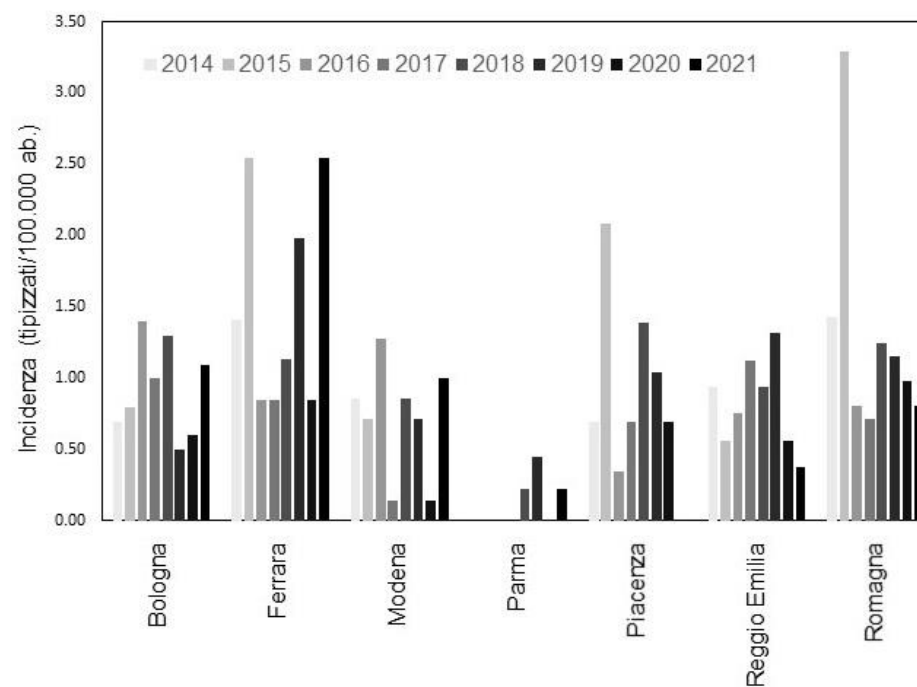
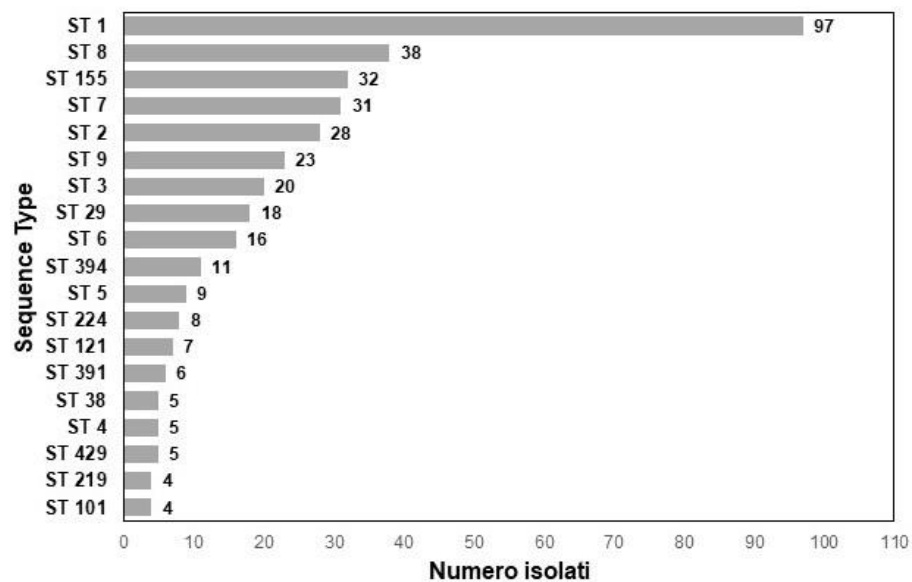


Fig. 6: Distribuzione dei principali (>1%) sequence type (ST) di *L. monocytogenes* isolati da infezioni umane negli anni 2012-2021.



2.1 Potenziali focolai diffusi di *L. monocytogenes* rilevati nell'anno 2021

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) è stato evidenziato, nell'anno 2021, un potenziale focolaio relativo 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 al cluster di listeriosi segnalato al sistema sanitario. In tabella è riportato il numero di casi presumibilmente attribuibili al focolaio sulla base della sorveglianza molecolare. L'ultima colonna riporta la differenza allelica (AD) in single linkage calcolata tra gli isolati del cluster. 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
2021_GCL_0007	4	Ago '19 – apr '21	FE	155	-	1

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) valutando la corrispondenza del genoma con quello di isolati di riferimento dei focolai in questione. Nell'anno 2021, il Centro ha fornito informazioni per le indagini relative a 8 allerte su *S. enterica* e altrettante allerte su *L. monocytogenes*.

Tab. 3: Allerte e richieste di informazioni nazionali e internazionali relative a *S. enterica* e *L. monocytogenes* nell'anno 2021 per le quali il Centro ha fornito informazioni

Richiedente	Codice Segnalazione	Oggetto	Data	Corrispondenza
ECDC	UI-695	Outbreak di <i>L. monocytogenes</i> ST7 in Danimarca	11/01/2021	Non rilevata
ECDC	UI-696	Outbreak di <i>L. monocytogenes</i> ST2 in USA	20/01/2021	Non rilevata
ISS		Outbreak di <i>S. Bovismorbificans</i>	06/05/2021	Rilevata
ECDC	UI-720	Outbreak di <i>S. Typhimurium</i>	06/05/2021	Non rilevata
ISS		Outbreak di <i>S. Mbandaka</i> , Havana e Braenderup	07/05/2021	Non rilevata
Min Sal	UI-719	Outbreak di <i>S. Braenderup</i> ST22	03/06/2021	Rilevata
ECDC	UI-726	Outbreak di <i>S. Weltevreden</i> ST365	09/06/2021	Non rilevata
ISS		Outbreak di <i>S. Enteritidis</i>	15/06/2021	Non rilevata
ISS		Outbreak di <i>S. Infantis</i>	18/06/2021	Non rilevata
ISS	UI-729	Outbreak di <i>L. monocytogenes</i>	05/07/2021	Non rilevata
ISS	UI 2021-FWD 00044	Outbreak di <i>L. monocytogenes</i> ST217	20/07/2021	Non rilevata
ISS		Outbreak di <i>S. Typhimurium</i> ST19	05/08/2021	Non rilevata
ISS	UI-2021-FWD-00062	Outbreak di <i>L. monocytogenes</i> ST7 in Norvegia	25/08/2021	Non rilevata
ISS	UI-2021-FWD-00073	Outbreak di <i>L. monocytogenes</i> ST3 in Francia	07/10/2021	Non rilevata
ISS	UI-2021-FWD-00085	Outbreak di <i>L. monocytogenes</i> ST511 in Svezia	14/10/2021	Non rilevata
ISS	UI-2021-FWD-00086	Outbreak di <i>L. monocytogenes</i> ST1593 in Austria	14/10/2021	Non rilevata

Bibliografia

Alikhan N-F, Zhou Z, Sergeant MJ, Achtman M (2018) A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. *PLoS Genet* 14(4): e1007261.

ECDC & EFSA (2021) Multi-country outbreak of *Salmonella* Braenderup ST22, presumed to be linked to imported melons -20 July 2021. Stockholm: ECDC/EFSA; 2021. EN-6807.

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:p=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