

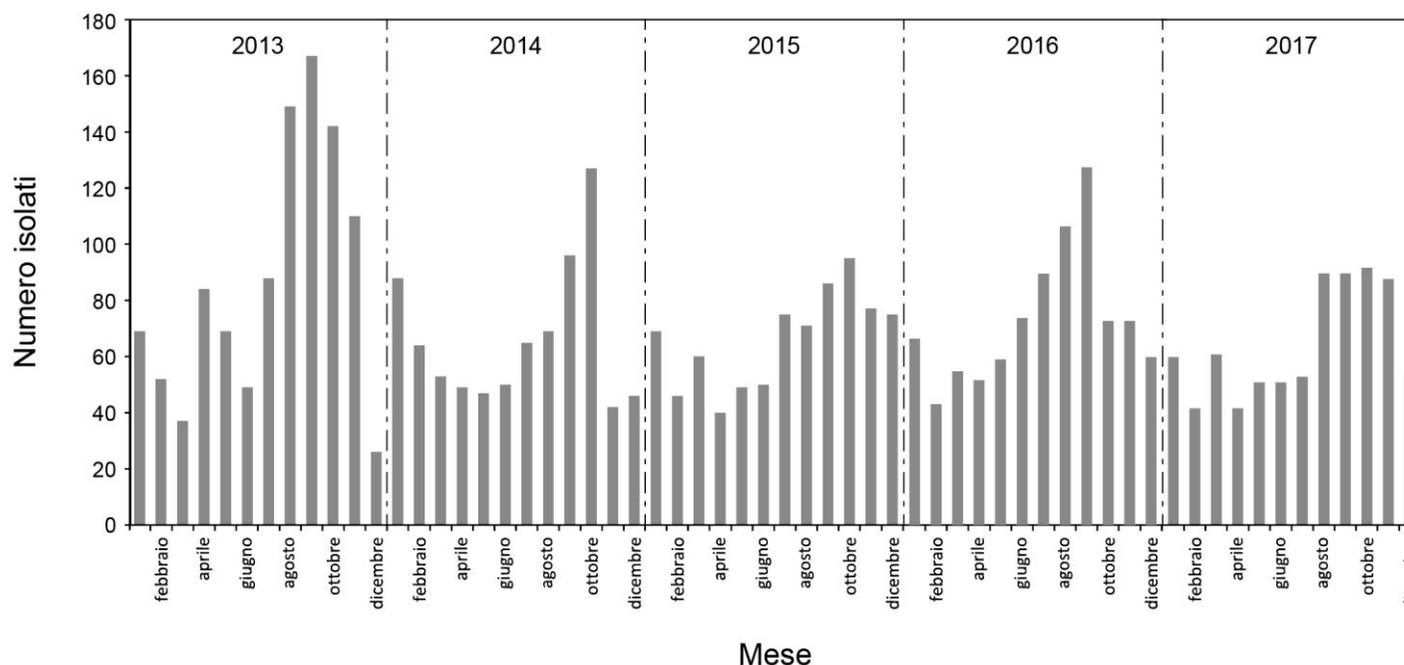


REPORT DELL'ATTIVITÀ DEL CENTRO ENTENET NELL'ANNO 2017

Aprile 2018

1. Sorveglianza su *Salmonella enterica*

Fig. 1: Isolati per mese di prelievo nel periodo 2013-2017



Periodo Gennaio-Dicembre 2017

Il report si riferisce ai 774 stipti di *Salmonella enterica* isolati dai pazienti della Regione Emilia-Romagna nel periodo gennaio-dicembre 2017 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 riferiti ai principali sierotipi (>1% degli isolamenti nel periodo di osservazione) di *Salmonella enterica* negli anni 2014-2017.

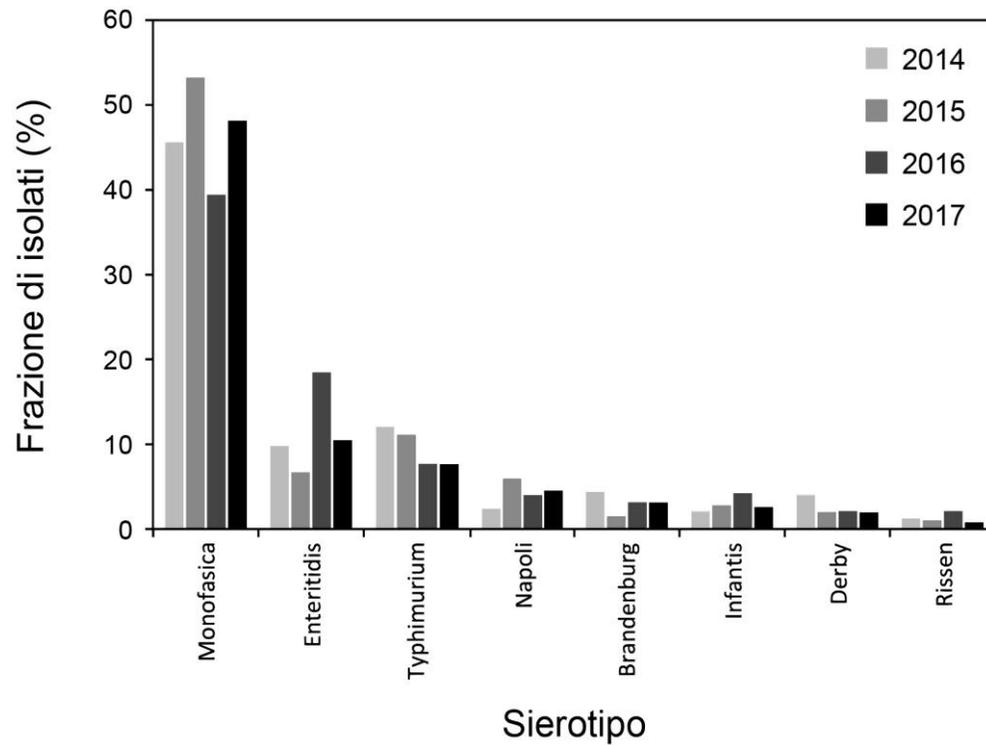
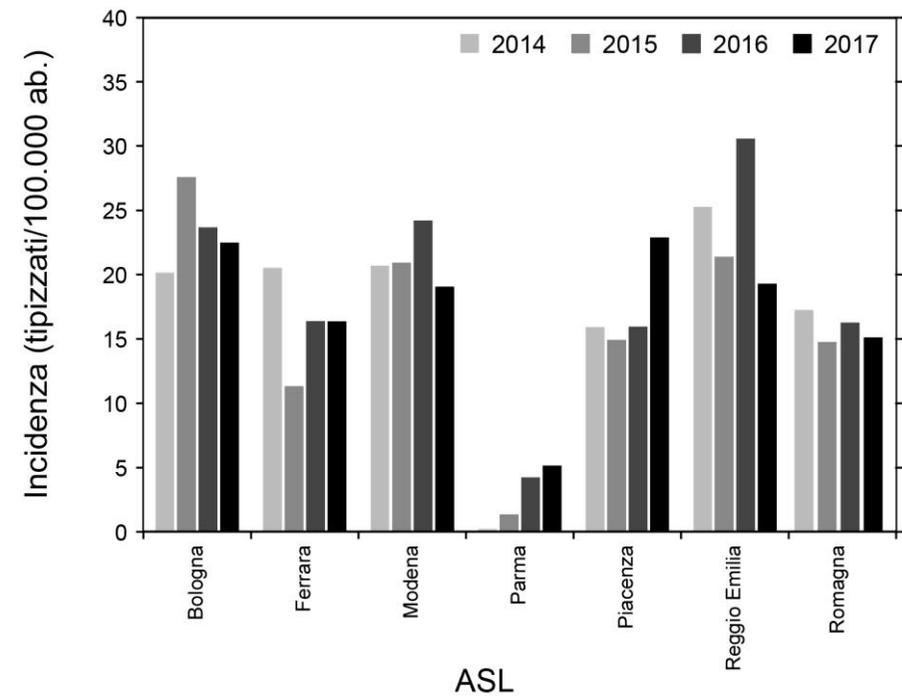


Fig. 3: Isolati di *Salmonella enterica* per 100.000 abitanti negli anni 2014-2017 distinti per ASL di prelievo.



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

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

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

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

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

Il sistema di allerta sopra descritto è in funzione dalla primavera del 2013 e, nell'anno 2017, ha segnalato 4 potenziali focolai di salmonellosi in regione Emilia-Romagna. Di questi 4, tre potenziali focolai, che sono risultati perdurare per diverse settimane, sono stati segnalati alle aziende sanitarie, mentre il rimanente è risultato essere un focolaio da *S. enterica* serovar Stanley già noto ai servizi di igiene pubblica regionali e locali che ha interessato 13 bambini in una scuola dell'infanzia nella provincia di Ferrara. Gli approfondimenti epidemiologici hanno confermato il focolaio identificando l'alimento responsabile in uno dei tre eventi indagati. Nel caso identificato, gli alimenti responsabili della contaminazione sono risultati essere prodotti a base di uova.

1.2 Potenziali focolai diffusi da *Salmonella enterica* rilevati nell'anno 2017

Attraverso l'analisi sistematica dei tracciati PFGE degli isolati di *Salmonella enterica* di origine umana effettuata presso il Centro Regionale e con l'ausilio del sistema di allerta in uso per l'individuazione di focolai sono stati evidenziati, nell'anno 2017, tre potenziali focolai relativi a isolati sierotipizzati e genotipizzati in tempo utile per procedere ad allerte sanitarie.

1.2.1 Focolaio #1: novembre 2016 – gennaio 2017

Nel periodo novembre 2016-gennaio 2017 è stato rilevato un potenziale focolaio epidemico diffuso principalmente nella provincia di Ravenna, ma con casi anche in altre province della Romagna e a Imola, che ha interessato 14 casi di tossinfezione con isolamento di *Salmonella enterica* Typhimurium 4,[5],12:i,- (variante monofasica) con genotipo STYMXB_PR.1433 molto raro nella popolazione (si veda 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 13 di questi isolati un singolo

genotipo MLVA (denominato con la stringa 3-8-12-NA-211), mentre il rimanente isolato presentava una differenza in un singolo locus. Analizzando 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 30 giorni prima dell'insorgere dei casi umani) in una salsiccia proveniente da uno stabilimento di produzione della provincia di Ravenna con punti vendita diretta nella stessa provincia e nella zona di Imola.

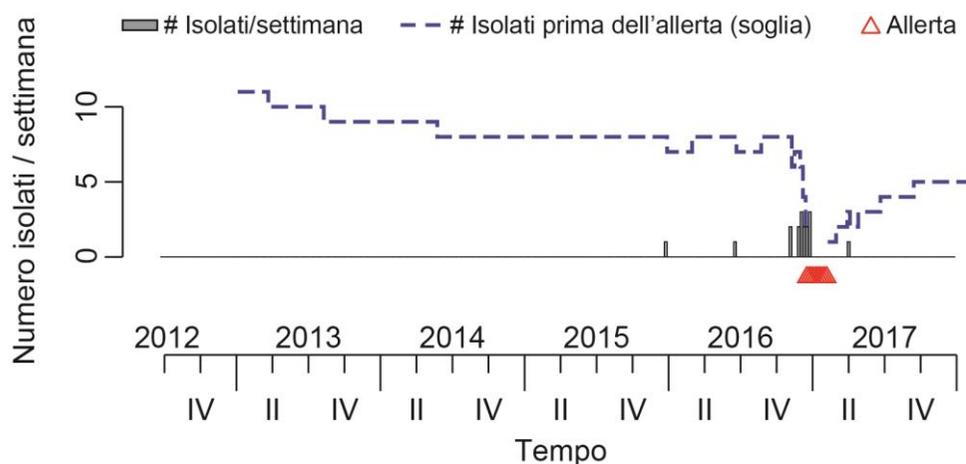


Fig. 4: Andamento nel tempo del numero di isolati settimanali di *Salmonella enterica* Typhimurium 4,[5],12:i,- (variante monofasica) con genotipo STYMXB_PR.1433 in Regione Emilia Romagna (barre grigie). La linea tratteggiata blu indica il numero minimo di casi settimanali previsto dal modello matematico sopra il quale scatta l'allerta epidemica. I triangoli rossi indicano la presenza di un potenziale focolaio diffuso.

1.2.2 Focolaio #2: agosto – ottobre 2017

Nel periodo agosto-ottobre 2017 è stato rilevato un potenziale focolaio epidemico diffuso nelle province di Bologna e Modena che ha interessato 27 casi di tossinfezione da *Salmonella enterica* Typhimurium 4,[5],12:i,- (variante monofasica) con genotipo STYMXB_PR.0004 (si veda Fig. 5). Approfondimenti microbiologici effettuati con la tecnica dell'MLVA hanno permesso di associare a 17 di questi isolati un singolo genotipo MLVA

(denominato con la stringa 3-11-10-NA-211), mentre 8 su 10 dei rimanenti isolati presentavano una differenza in un singolo locus. Si sottolinea che il pulsotipo in questione mostra un andamento endemico nella popolazione rendendo non univoca l'attribuzione al focolaio dei casi con MLVA variante. Una fonte comune di infezione non è stata identificata.

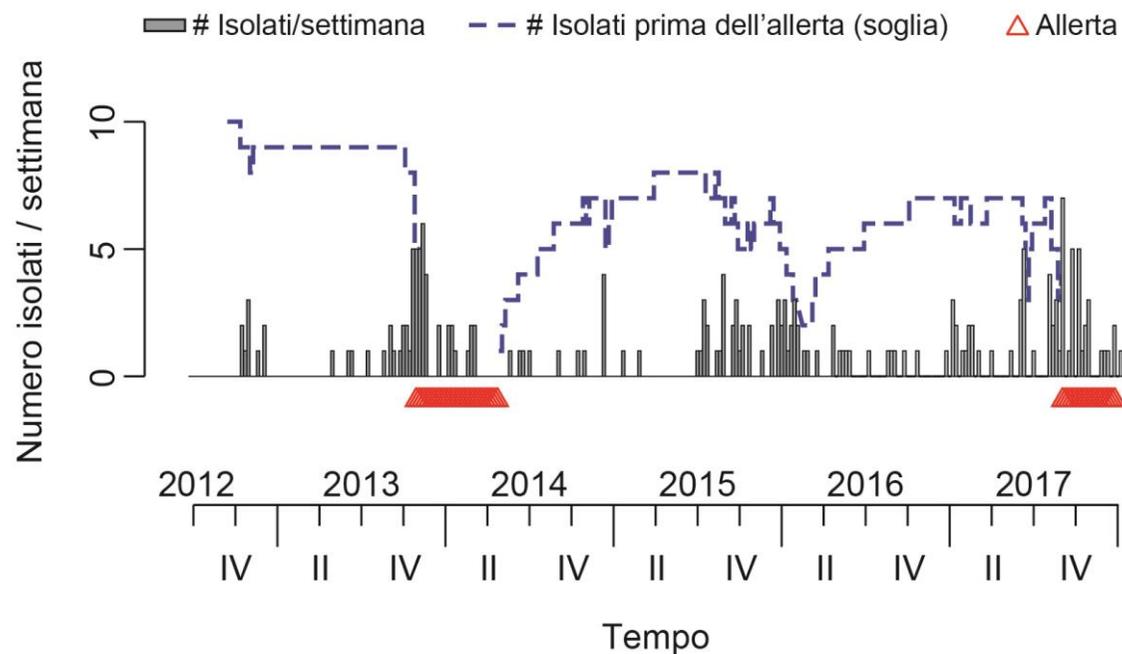


Fig. 5: Andamento nel tempo del numero di isolati settimanali di *Salmonella enterica* Typhimurium 4,[5],12:i,- (variante monofasica) con genotipo STYMXB_PR.0004 in Regione Emilia Romagna (barre grigie). La linea tratteggiata blu indica il numero minimo di casi settimanali previsto dal modello matematico sopra il quale scatta l'allerta epidemica. I triangoli rossi indicano la presenza di un potenziale focolaio diffuso.

1.2.3 Focolaio #3: settembre – dicembre 2017

Nel periodo settembre-dicembre 2017 è stato rilevato un potenziale focolaio epidemico diffuso nelle province di Reggio Emilia e Modena che ha interessato 17 casi di tossinfezione da *Salmonella enterica* Enteritidis (*S. Enteritidis*) con genotipo SXB_PR.0112. Approfondimenti microbiologici effettuati con la tecnica dell'MLVA, hanno permesso di associare a tutti questi isolati un singolo genotipo MLVA (denominato 5-5-8-7). Nel database IZSLER degli isolamenti da matrici animali e alimentari, sono stati riscontrati due isolamenti con stesso profilo PFGE dei casi umani e con profili MLVA che presentavano un singolo repeat di differenza (5-6-8-7) rispetto ai casi. Tali isolamenti erano stati effettuati il 1° dicembre 2017 in un allevamento di galline ovaiole all'interno del piano di monitoraggio specifico di questo comparto, nella provincia di Reggio Emilia. Allo scopo di migliorare la comprensione delle dinamiche epidemiologiche in atto, sono state effettuate alcune indagini con tecniche di Whole-Genome Sequencing (WGS) sugli isolati umani e veterinari 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 20 isolati: 17 casi del presunto focolaio, 2 isolati dall'allevamento sospetto e uno stipite di collezione con stesso profilo PFGE dei casi avente il ruolo di outgroup (si veda maggiori dettagli metodologici Morganti et al.

2018). L'analisi genomica mostra la presenza di un cluster filogenetico che comprende 16 casi dalle province di Reggio Emilia e Modena e i due isolati provenienti dall'allevamento sospetto (area in grigio). Tale cluster è caratterizzato da elevata similarità genomica con differenze *pairwise* tra isolati umani e isolati provenienti dall'allevamento sospetto di 0-5 SNPs (mediana = 3,5). 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. A seguito del risanamento dell'allevamento infetto conseguente al focolaio, non sono stati più individuati in regione Emilia-Romagna casi umani di *S. Enteritidis* con genotipi PFGE e MLVA corrispondenti al focolaio.



Fig. 6: Albero filogenetico ottenuto da sequenze di 20 isolati di *S. Enteritidis* con profilo PFGE SXB_PR.0112. 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 (che differiscono per meno di 6 SNPs dagli isolati dell'allevamento sospetto).

2. Sorveglianza su *Listeria monocytogenes*

A partire dagli ultimi mesi del 2017 il Centro di Riferimento Regionale Enteric Emilia-Romagna svolge anche attività di sorveglianza su *Listeria monocytogenes* basata su metodiche di Whole-Genome Sequencing (WGS). Tale sorveglianza è diventata sistematica nel gennaio 2018. La sorveglianza è eseguita in due fasi. 1) L'analisi preliminare per l'individuazione di cluster genomici che possono costituire potenziali focolai viene effettuata mediante *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 disponibile su cgMLST suggerisce l'utilizzo di un cut-off di massimo 7 mismatch allelici per la definizione dei cluster genomici (Moura et al. 2016). 2) Nel caso il cgMLST identifichi cluster genomici che potrebbero costituire un potenziale focolaio, indagini supplementari vengono effettuate con analisi di SNPs in maniera analoga a quanto descritto per *Salmonella* (si veda Morganti et al. 2018).

Siccome è noto dalla letteratura che i focolai da *L. monocytogenes* possono perdurare per mesi o anni, il Centro ha effettuato un'analisi retrospettiva in WGS su tutti gli isolati di *L. monocytogenes* del 2017 allo scopo di identificare eventuali focolai diffusi di lungo periodo. L'analisi retrospettiva

è stata effettuata sugli isolati provenienti da 31 casi di listeriosi in regione Emilia-Romagna. La Fig. 7 rappresenta la cluster analysis basata sui profili di cgMLST degli stipti di *L. monocytogenes* isolati nel 2017. La figura mostra la presenza di cinque cluster, ciascuno costituito da 2/3 isolati aventi profili simili (nodi compresi nell'area arancione), cioè con numero di mismatch allelici inferiore al cut-off. 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. Coerentemente con questa considerazione, analisi retrospettive 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).

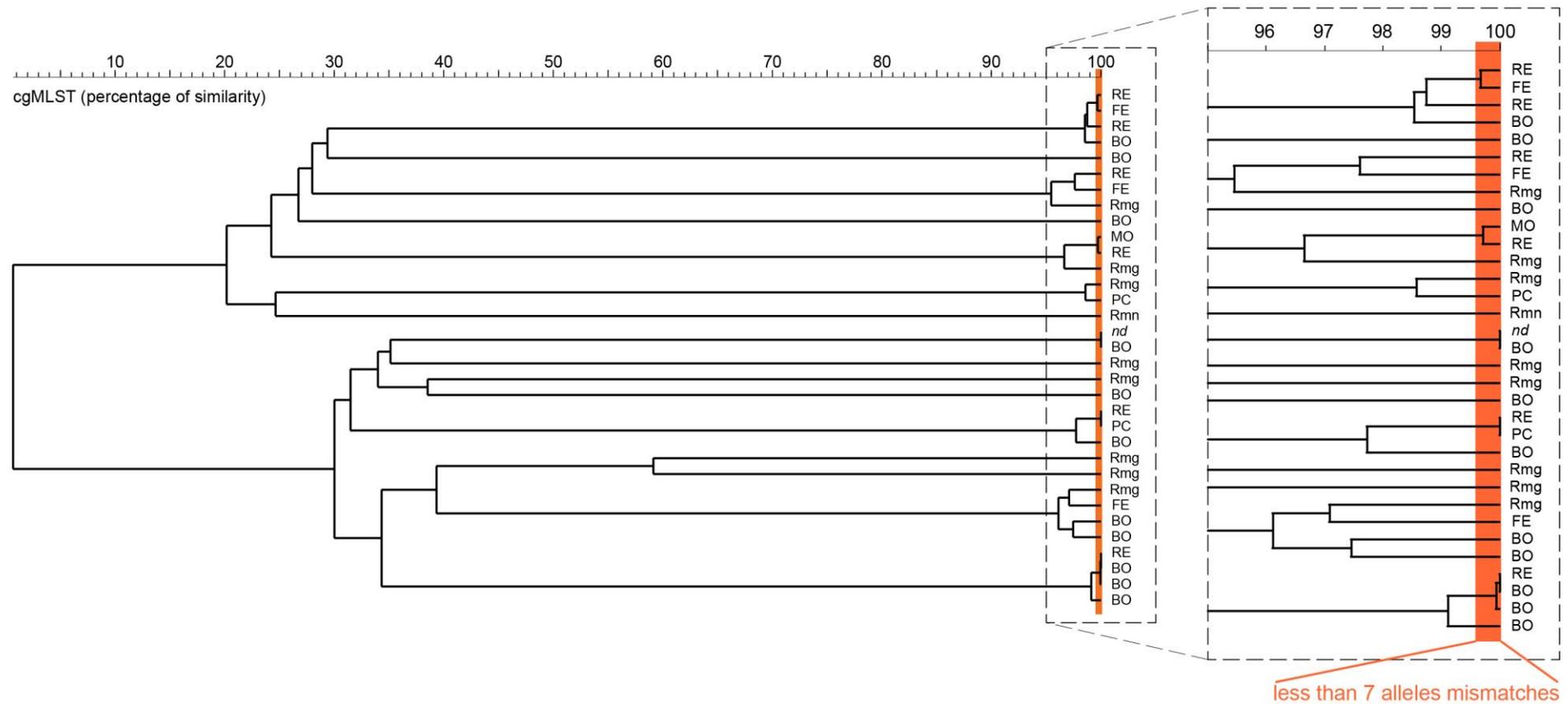


Fig. 7: Cluster analisi basata sui profili di cgMLST di 31 isolati di *L. monocytogenes* isolati in pazienti in regione Emilia-Romagna nel 2017. L'area arancione rappresenta percentuali di similarità di cgMLST inferiori al cut-off assunto di 7 alleli. Per ogni ceppo è indicata l'ASL di provenienza: Rmg (Romagna), altre sigle corrispondono alle province, *nd* (non disponibile).

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.

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: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.