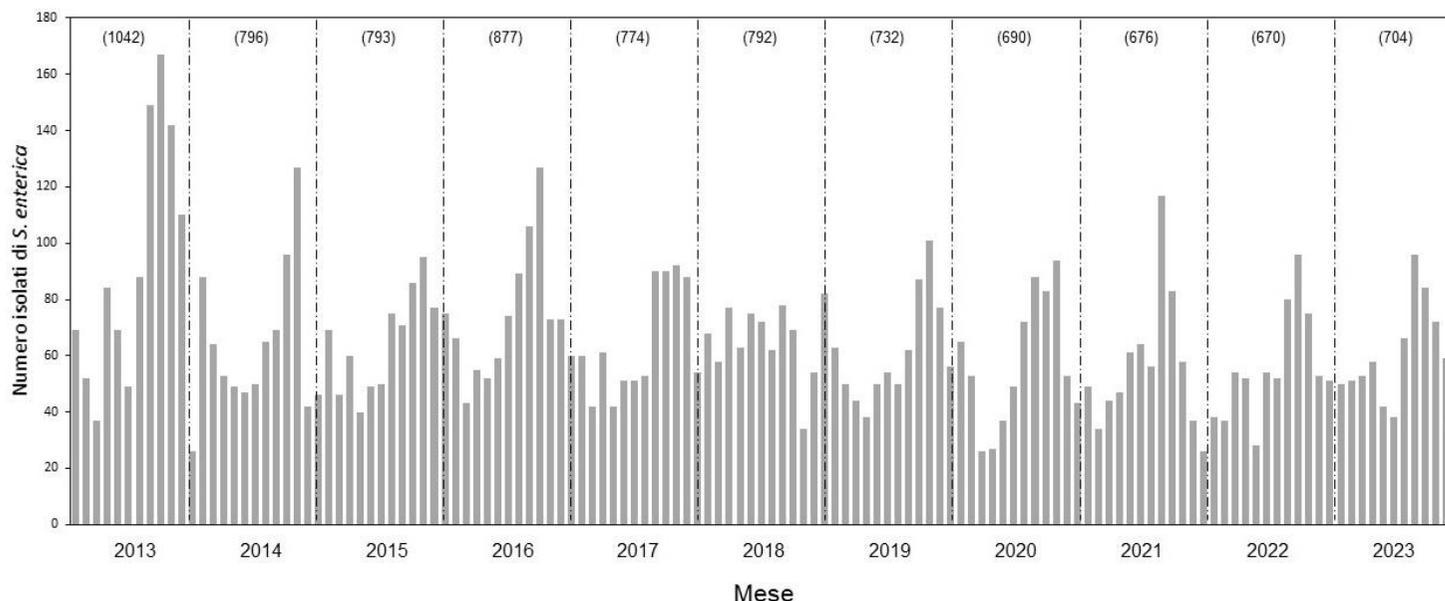




1. Sorveglianza su *Salmonella enterica*

Fig. 1: Isolati per mese di prelievo di *S. enterica* nel periodo 2013- 2023. Tra parentesi il totale degli stipti isolati per anno.



Periodo Gennaio-Dicembre 2023

Il report si riferisce ai 704 stipti di *Salmonella enterica* isolati dai pazienti della Regione Emilia-Romagna nel periodo gennaio-dicembre 2023 e inviati al Centro di Referenza Regionale Enteropatogeni presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER), Unità di Analisi del Rischio ed Epidemiologia Genomica (AREG).

Fig. 2: Percentuale di isolati appartenenti ai principali sierotipi di *Salmonella enterica* negli anni 2014-2023 (sierotipi con >2% degli isolamenti nel periodo di osservazione).

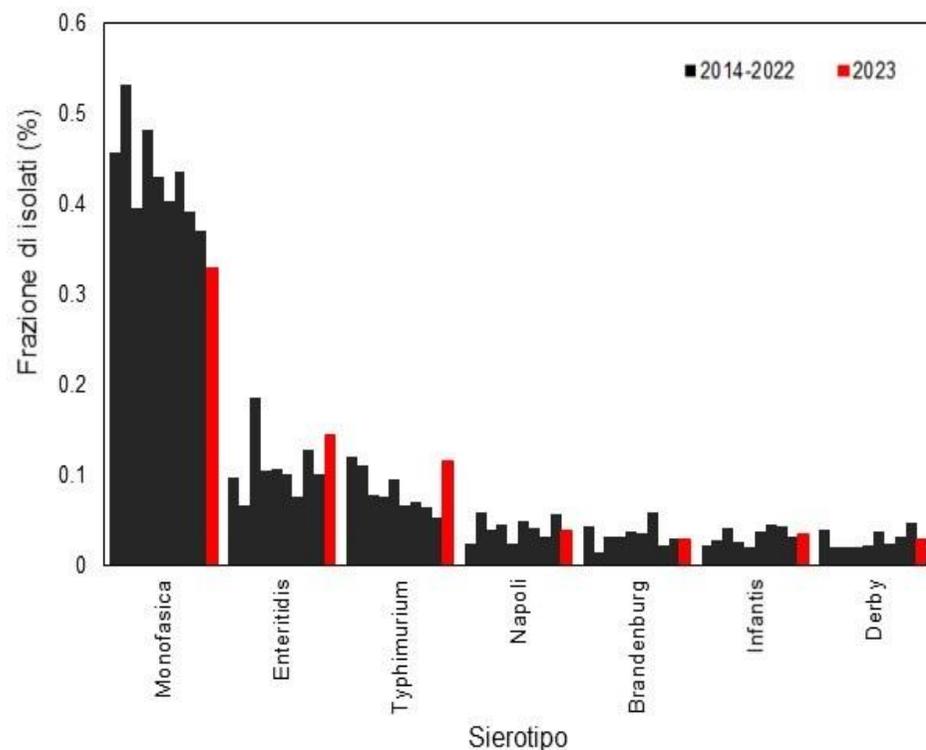
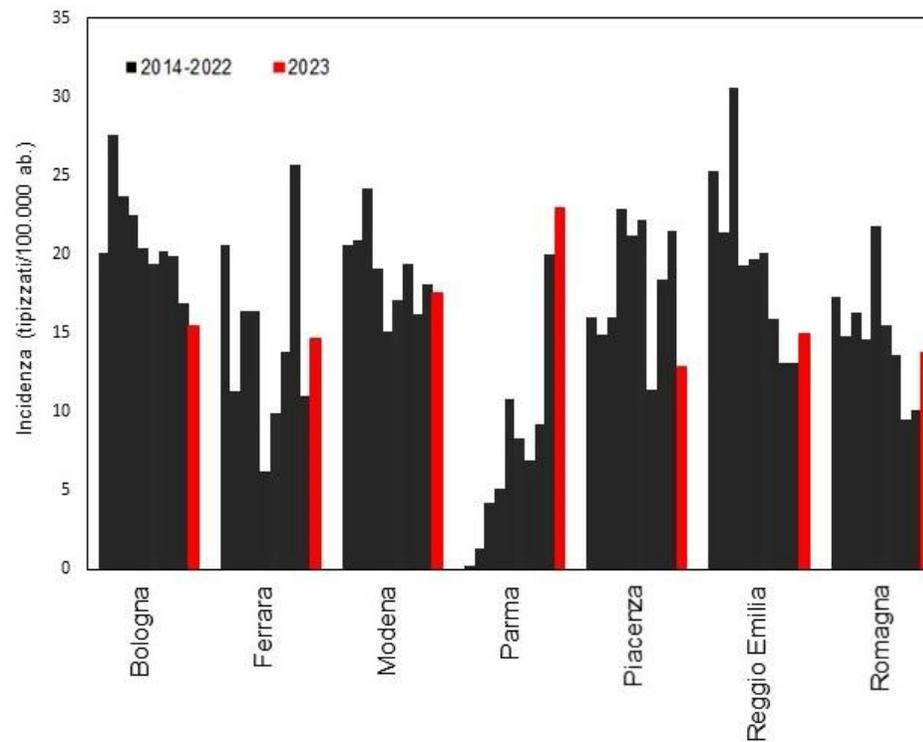


Fig. 3: Isolamenti di *Salmonella enterica* per 100.000 abitanti negli anni 2014-2023 in funzione della provincia/ASL di prelievo.



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

Al Centro di Referenza Regionale Enteropatogeni Emilia-Romagna vengono inviati i ceppi di *Salmonella enterica* isolati dai Laboratori di microbiologia clinica della Regione. I ceppi vengono genotipizzati al fine di produrre informazioni utili alla comprensione dell'insorgenza e dell'origine delle salmonellosi.

La Fig. 1 mostra l'andamento nel tempo, su base mensile, degli isolamenti di *Salmonella enterica* in regione Emilia-Romagna nel periodo 2013-2023. A partire dal gennaio 2021, tutti gli stipiti di *S. enterica* isolati da casi umani o dalla catena alimentare, conferiti al Centro, sono tipizzati con Whole Genome Sequencing (WGS). 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. 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 predefinito di circa 3000 geni di *S. enterica* precedentemente validati (Alikhan et al. 2018). Il cut-off utilizzato per la definizione dei cluster genomici è di massimo 3 mismatch allelici in *single-linkage clustering* (equivalente a una similarità minima del 99.9% tra genomi).

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 per

discriminare l'appartenenza o meno di un genoma a un cluster rispetto a cgMLST) per la conferma del cluster stesso.

I tre criteri adottati presso il Centro 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 queste evidenze il Centro segnala al Servizio Sanitario Regionale la presenza di potenziali focolai di *S. enterica* quando in un periodo di 2 mesi individua: i) cluster genomici (definiti come sopra) di 4 o più casi umani; o ii) cluster genomici di 2 o più casi umani e uno o più isolati nella catena alimentare.

Il Centro analizza inoltre le possibili correlazioni epidemiologico molecolari tra gli stipiti isolati in ambito regionale e altri attenzionati a livello nazionale ed internazionale perché coinvolti in focolai di infezione di larga scala.

1.2 Potenziali focolai diffusi di *Salmonella enterica* rilevati nell'anno 2023

Nell'anno 2023, il sistema di individuazione di potenziali focolai, attivo presso il Centro, basato sull'analisi sistematica in WGS degli isolati di *Salmonella enterica* di origine umana, ha evidenziato 22 cluster genomici indicativi di altrettanti potenziali focolai. Parallelamente, le analisi di correlazione molecolare vengono estese anche agli isolati alimentari e animali routinariamente ricevuti di routine da IZSLER o specificamente prelevati in associazione ai focolai.

Tab. 1: Riepilogo delle informazioni relative ai cluster di salmonellosi segnalati al sistema sanitario nel 2023. 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 clustering calcolata tra isolati del cluster secondo lo schema Enterobase.

Cluster ID	Casi	AUSL Coinvolte	Isolati nella catena alimentare	Sierotipo	AD	
2023_GCS_0141_01	6	BO, FE, RE	1	Brandenburg	2	
2023_GCS_0176_01	3	ROM	1	Monofasica	1	
2023_GCS_0261_01	15	BO, FE, MO, PC, PR, RE, ROM	6	Monofasica	3	
2023_GCS_0286_01	7	BO, MO, RE	-	Monofasica	1	
2023_GCS_0297_01	7	PR, RE	2	Monofasica	1	
2023_GCS_0300_01	6	BO, PR, RE	1	Monofasica	2	
2023_GCS_0374	9	MO, PC, PR	-	Typhimurium	1	
2023_GCS_0382	6	PR, RE	-	Newport	1	
2023_GCS_0387	13	BO, PR, ROM	-	Monofasica	1	
2023_GCS_0400	4	ROM	-	Typhimurium	0	
2023_GCS_0403	11	BO, ROM	-	Enteritidis	2	
2023_GCS_0411	10	BO, FE, MO, PR, ROM	5	Monofasica	1	
2023_GCS_0412	10	BO, PC, RE, ROM	3	Enteritidis	1	
2023_GCS_0413	34	MO, PC, PR, RE	2	Typhimurium	2	
2023_GCS_0420	5	ROM	1	Enteritidis	1	
2023_GCS_0421*	3	PC	4	Stanley	0	*Parte di un focolaio multi-regionale
2023_GCS_0425	4	FE, RE, ROM	2	Brandenburg	1	
2023_GCS_0429**	2	ROM	2	Enteritidis	1	**Parte di un focolaio internazionale
2023_GCS_0432	6	FE, ROM	-	Monofasica	2	
2023_GCS_0436	5	MO, PR, RE	-	Monofasica	1	
2023_GCS_0439	3	BO, MO	2	Monofasica	0	
2023_GCS_0443	6	MO, PR, RE	2	Goldcoast	1	

2. Sorveglianza su *Listeria monocytogenes*

Periodo Gennaio-Dicembre 2023

Il report si riferisce ai 54 stipiti di *Listeria monocytogenes* isolati dai pazienti della Regione Emilia-Romagna nel periodo gennaio-dicembre 2023 e inviati al Centro di Referenza Regionale Enteropatogeni 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 2013-2023. A partire dagli ultimi mesi del 2017 il Centro di Referenza Regionale Enteropatogeni 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). Il cut-off utilizzato per la definizione dei cluster genomici è di massimo 3 mismatch allelici in *single-linkage clustering* (equivalente a una similarità minima del 99.83% tra genomi).

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 queste evidenze il Centro segnala al Servizio Sanitario Regionale la presenza di potenziali focolai di *L. monocytogenes* quando in un periodo di 1 anno individua: i) cluster genomici (definiti come sopra) di 4 o più casi umani; o ii) cluster genomici di 2 o più casi umani e uno o più isolati nella catena alimentare.

Si sottolinea che 32 dei 54 isolati di *L. monocytogenes* del 2023 appartengono a cluster genomici segnalati (59% 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 negli anni precedenti.

Il Centro analizza inoltre le possibili correlazioni epidemiologico molecolari tra gli stipiti isolati in ambito regionale e altri attenzionati a livello nazionale ed internazionale perché coinvolti in focolai di infezione di larga scala.

Fig. 4: Isolati di *L. monocytogenes* per anno di prelievo nel periodo 2013-2023. In parentesi il totale degli stipiti isolati per anno.

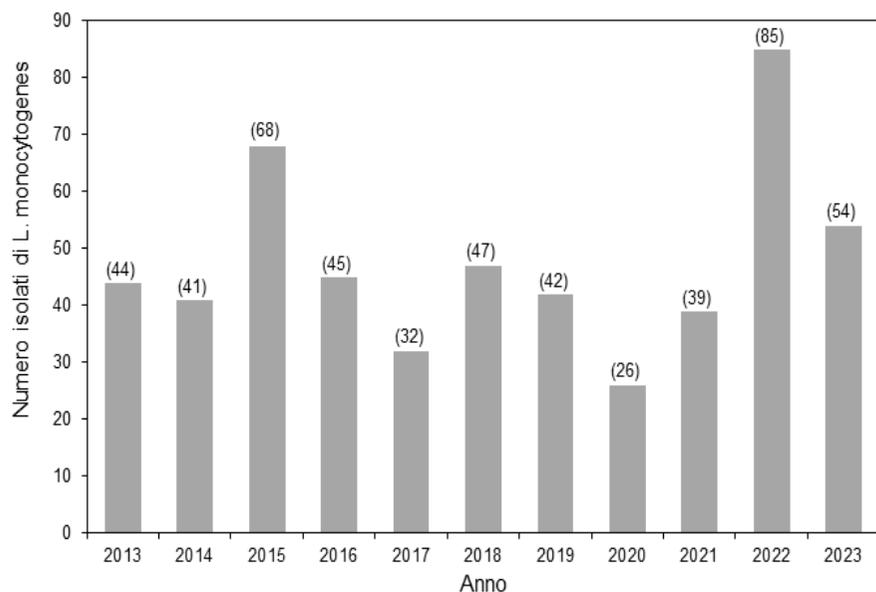


Fig. 5: Isolamento di *Listeria monocytogenes* per 100.000 abitanti negli anni 2014-2023 in funzione della provincia/ASL di prelievo.

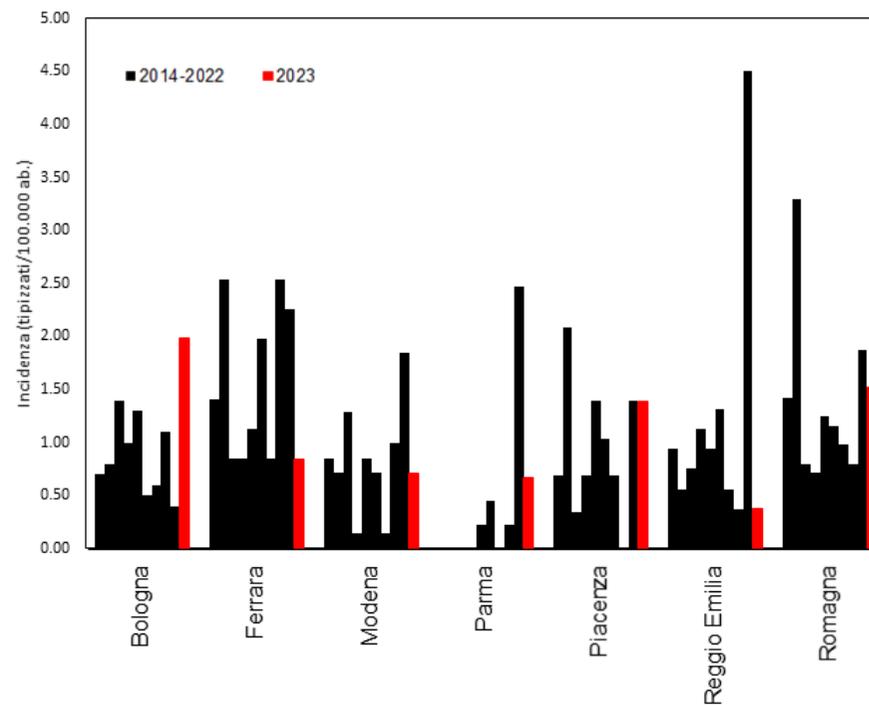
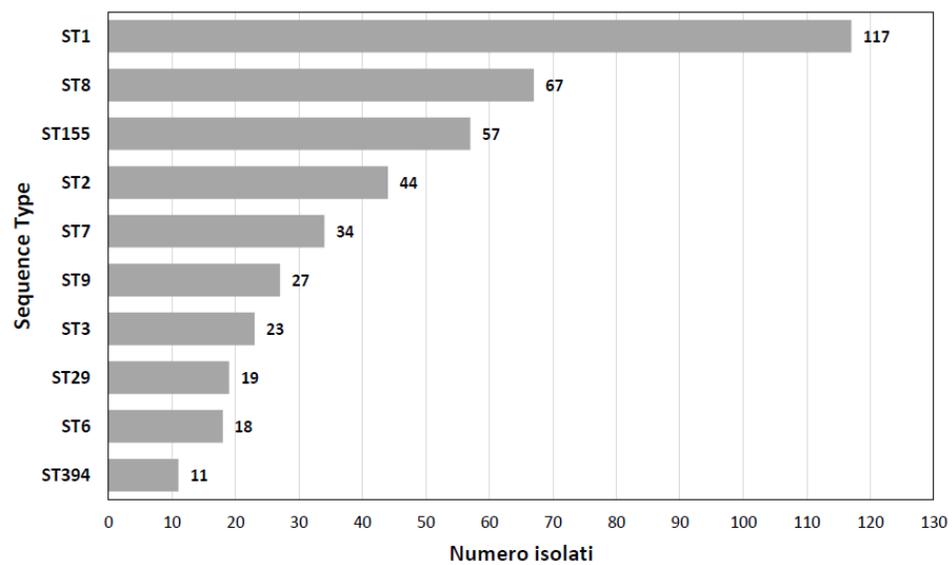


Fig. 6: Distribuzione dei principali (>2%) Sequence Type (ST) di *L. monocytogenes* isolati da infezioni umane negli anni 2012-2023.



2.1 Potenziali focolai diffusi di *L. monocytogenes* rilevati nell'anno 2023

Attraverso le analisi degli isolati di *Listeria monocytogenes* di origine umana sequenziati in WGS (effettuate con schema allelico in cgMLST) sono stati evidenziati, nell'anno 2023, quattro potenziali focolai. Parallelamente all'identificazione dei cluster di isolati umani, le analisi di correlazione molecolare vengono eseguite anche sugli isolati alimentari e animali ricevuti di routine da IZSLER o specificamente in associazione ai focolai.

Tab. 2: Riepilogo delle informazioni relative ai cluster di listeriosi segnalati 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 clustering calcolata tra gli isolati del cluster. La AD è determinata secondo lo schema di Moura et al. (2016).

Cluster ID	Casi	AUSL Coinvolte	Sequence Type	Isolati nella catena alimentare	AD
2023_GCL_0112*	2	RE, MO	155	3	2
2023_GCL_0309**	5	RE, ROM	1	12	2
2023_GCL_0394*	0	BO, ROM	1607	2	2
2023_GCL_0397	5	MO, RE, ROM	101	-	2

*Parte di un focolaio internazionale

**Parte di un focolaio nazionale

3. Sorveglianza su *Campylobacter spp.*

Periodo Gennaio-Dicembre 2023

Il report si riferisce ai 793 stipiti di *Campylobacter spp.* isolati dai pazienti della Regione Emilia-Romagna nel periodo maggio-dicembre 2023 e inviati al Centro di Referenza Regionale Enteropatogeni presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER).

A partire da maggio 2023 il Centro di Referenza Regionale Enteropatogeni Emilia-Romagna svolge anche attività di sorveglianza molecolare su *Campylobacter spp.* basata su WGS. Le attività svolte nel 2023 si sono concentrate sulla messa a punto, portata avanti in collaborazione con i laboratori ospedalieri che partecipano alla sorveglianza, delle modalità di conservazione e spedizione degli stipiti di *Campylobacter spp.* presso il Centro. Questa messa a punto, resa necessaria dalle criticità intrinseche alla gestione dei ceppi di *Campylobacter spp.*, ha portato col tempo a una significativa riduzione della frazione di stipiti conferiti al centro che non risultavano idonei al sequenziamento WGS perché non vitali. La Fig. 7 mostra l'andamento nel tempo su base mensile dei conferimenti di *Campylobacter spp.* in regione Emilia-Romagna dal maggio 2023. La Fig. 7 include sia gli stipiti che sono stati oggetto di sequenziamento WGS (tot 499, in nero), sia quelli che non sono risultati idonei al sequenziamento (tot 294, in grigio).

L'identificazione di specie di *Campylobacter spp.* viene effettuata *in-silico* a partire dal dato di sequenziamento WGS. Dei 499 stipiti tipizzati in WGS nel 2023, 428 (85.8%) sono risultati essere *C. jejuni*, 68 (13.6%) *C. coli*, 2 *C. fetus* e 1 *C. lari*.

Al momento, la procedura per identificazione di potenziali focolai di *Campylobacter spp.* si svolge con analisi basate sugli SNPs analogamente a quanto descritto per *Salmonella* (si veda anche Morganti et al. 2018). Una

procedura di screening basata su cgMLST (analogamente a quanto viene fatto per *S. enterica* e *L. monocytogenes*) è attualmente in corso di sviluppo.

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 queste evidenze il Centro segnala al Servizio Sanitario Regionale la presenza di potenziali focolai di *Campylobacter spp.* quando in un periodo di 2 mesi individua: i) cluster genomici (definiti come sopra) di 4 o più casi umani; o ii) cluster genomici di 2 o più casi umani e uno o più isolati nella catena alimentare.

Nel 2023 non sono stati identificati cluster di *Campylobacter spp.* secondo le modalità sopra descritte che potessero essere indicativi di possibili focolai in corso.

Fig. 7: Isolati di *Campylobacter spp.* per mese di prelievo nel 2023. In nero gli stipiti che sono stati oggetto di sequenziamento WGS (tot 499), in grigio quelli che non sono risultati idonei al sequenziamento perché non vitali (tot 294).

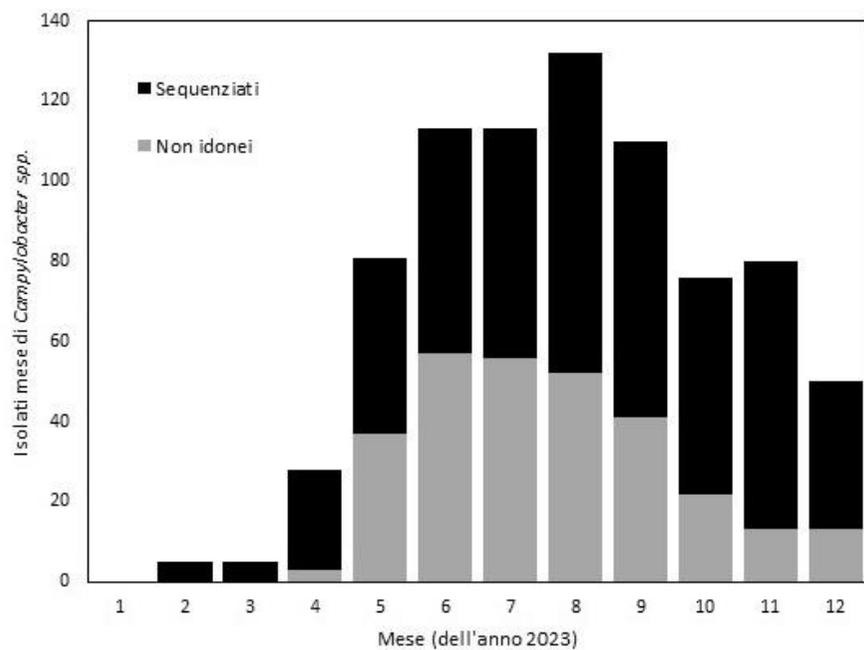
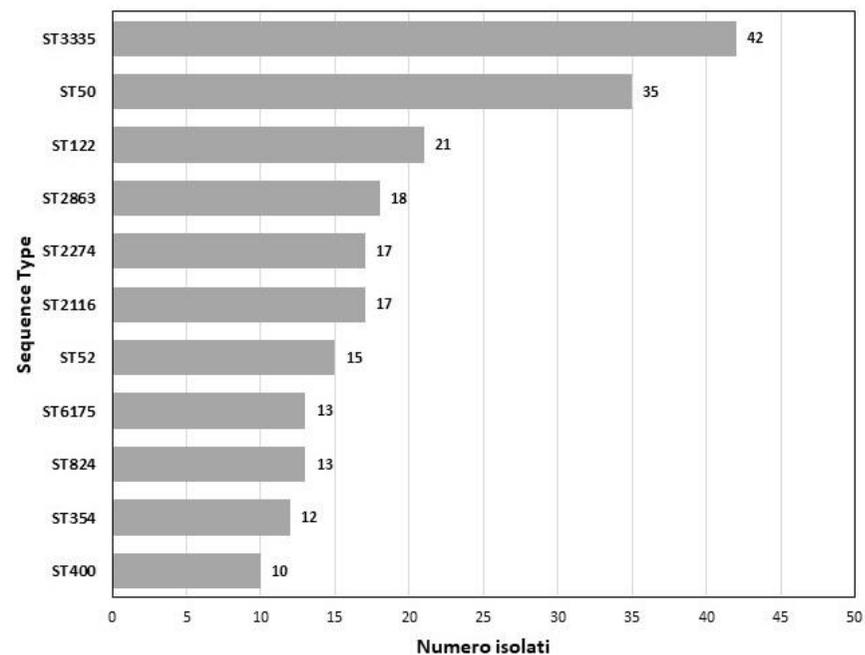


Fig. 8: Distribuzione dei principali (>2%) Sequence Type (ST) di *Campylobacter spp.* isolati da infezioni umane nel 2023



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.

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

Berni Melissa

Bracchi Chiara

Dodi Alessandra

Mazzerà Laura

Menziozzi Ilaria

Morganti Marina

Scaltriti Erika

Tambassi Martina

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