

SALMONELLA, SIEROTIPI TARGET E SIEROTIPI EMERGENTI: STATO DELL'ARTE

Lisa Barco

Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi, IZSVe

VIII SIMPOSIO SCIENTIFICO SIPA

Forlì 24 novembre 2023



● Di cosa vi parlo?



- Sorveglianza routinaria - cosa ci dicono i risultati del PNCS
- Sorveglianza dei focolai di malattia alimentare
- Attività di ricerca

● DA DOVE PARTIAMO.....



ALLEGATO III

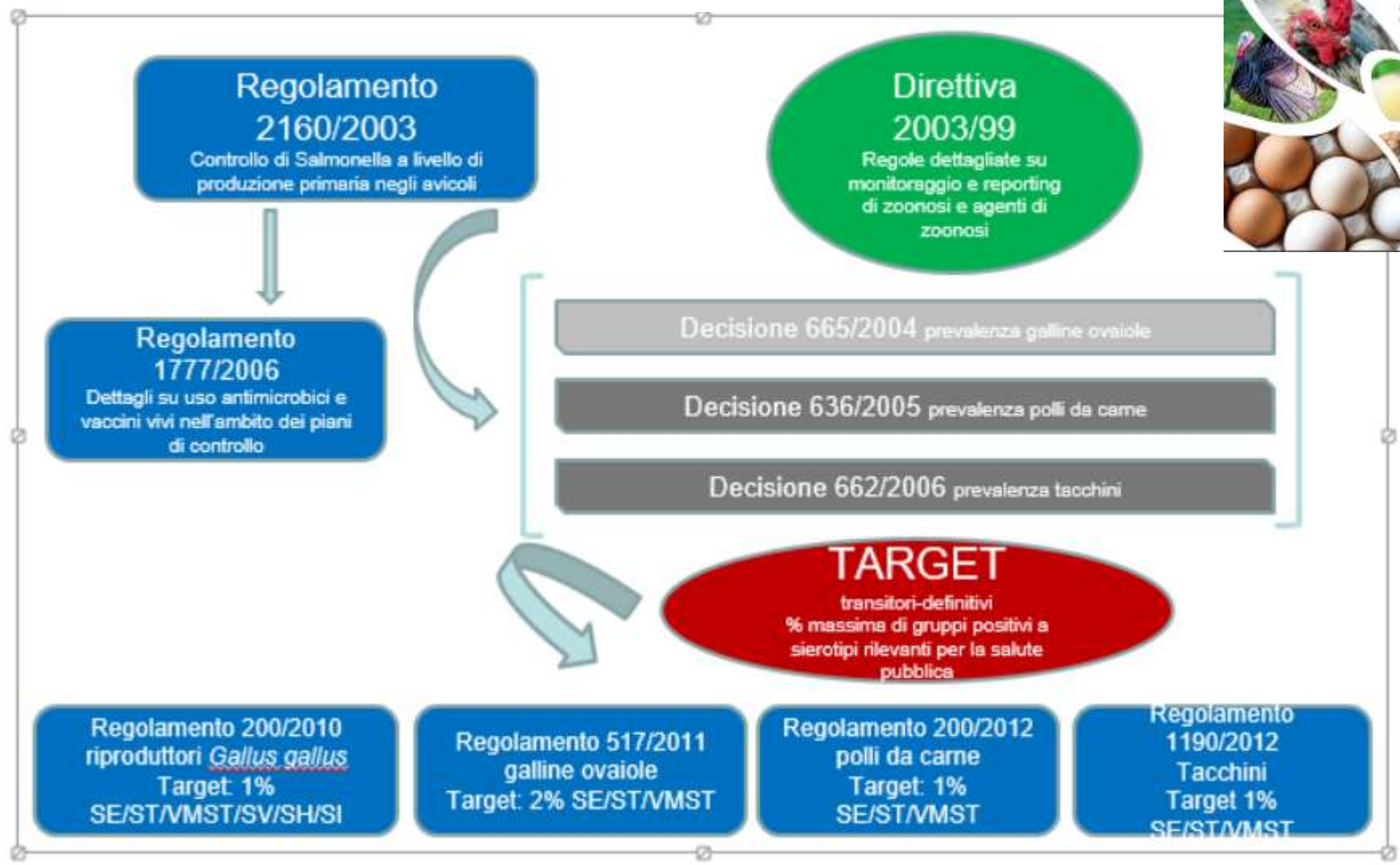
Criteri specifici per determinare i sierotipi di *Salmonella* rilevanti per la sanità pubblica

Nel determinare quali siano i sierotipi di *Salmonella* rilevanti per la sanità pubblica, cui si applicano gli obiettivi comunitari, devono essere tenuti presenti i seguenti criteri:

- 1) i sierotipi più frequenti di *Salmonella* nella salmonellosi umana sulla base di dati raccolti attraverso i sistemi CE di monitoraggio;
- 2) le fonti di infezione (vale a dire la presenza del sierotipo nelle popolazioni animali e nei mangimi);
- 3) il fatto che un sierotipo presenti una capacità recente di diffondersi rapidamente e di provocare malattie negli esseri umani e negli animali;
- 4) il fatto che i sierotipi evidenzino una maggiore virulenza, ad esempio rispetto all'invasività, o resistenza alle terapie per le infezioni umane.

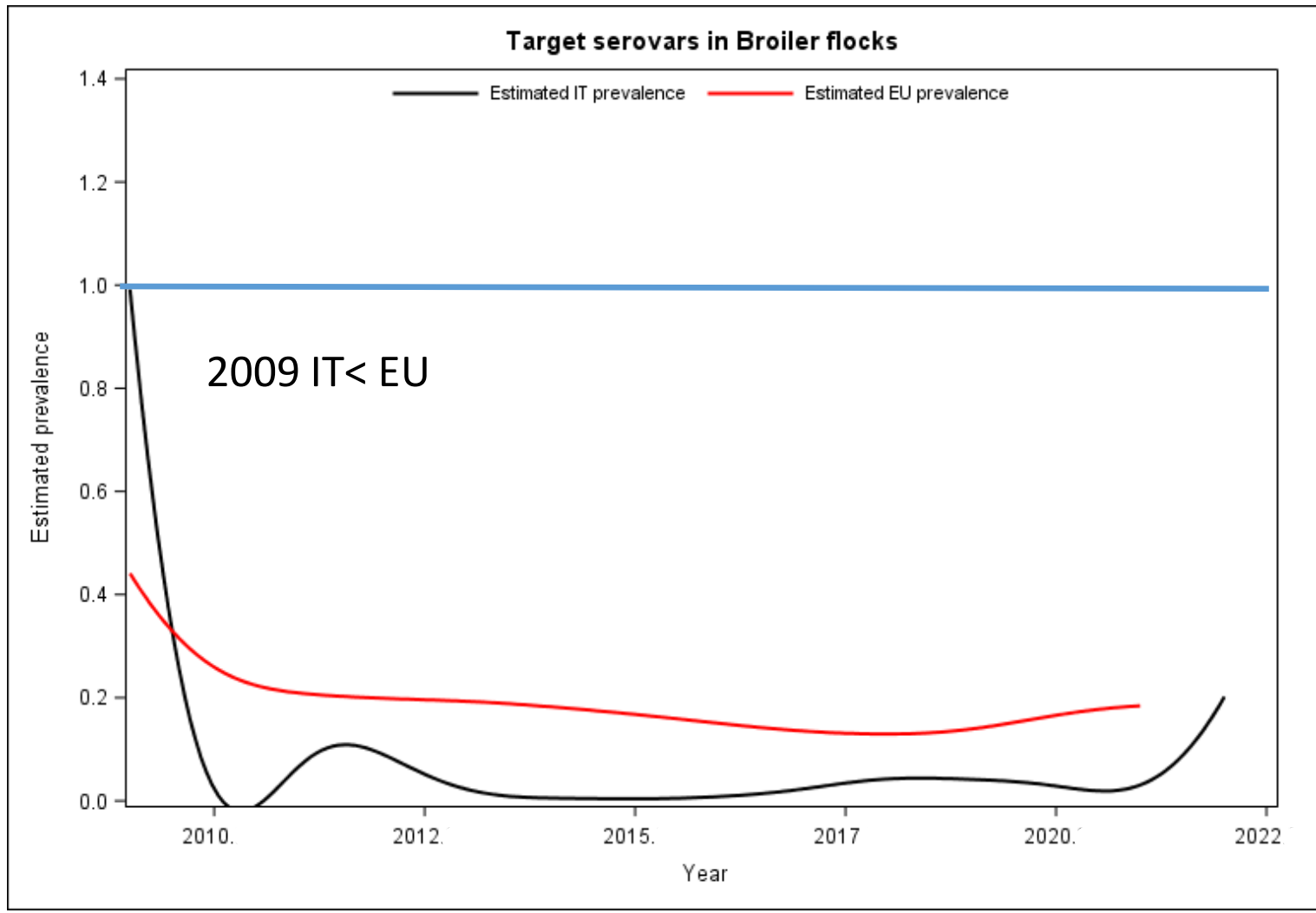


SORVEGLIANZA - PNCS

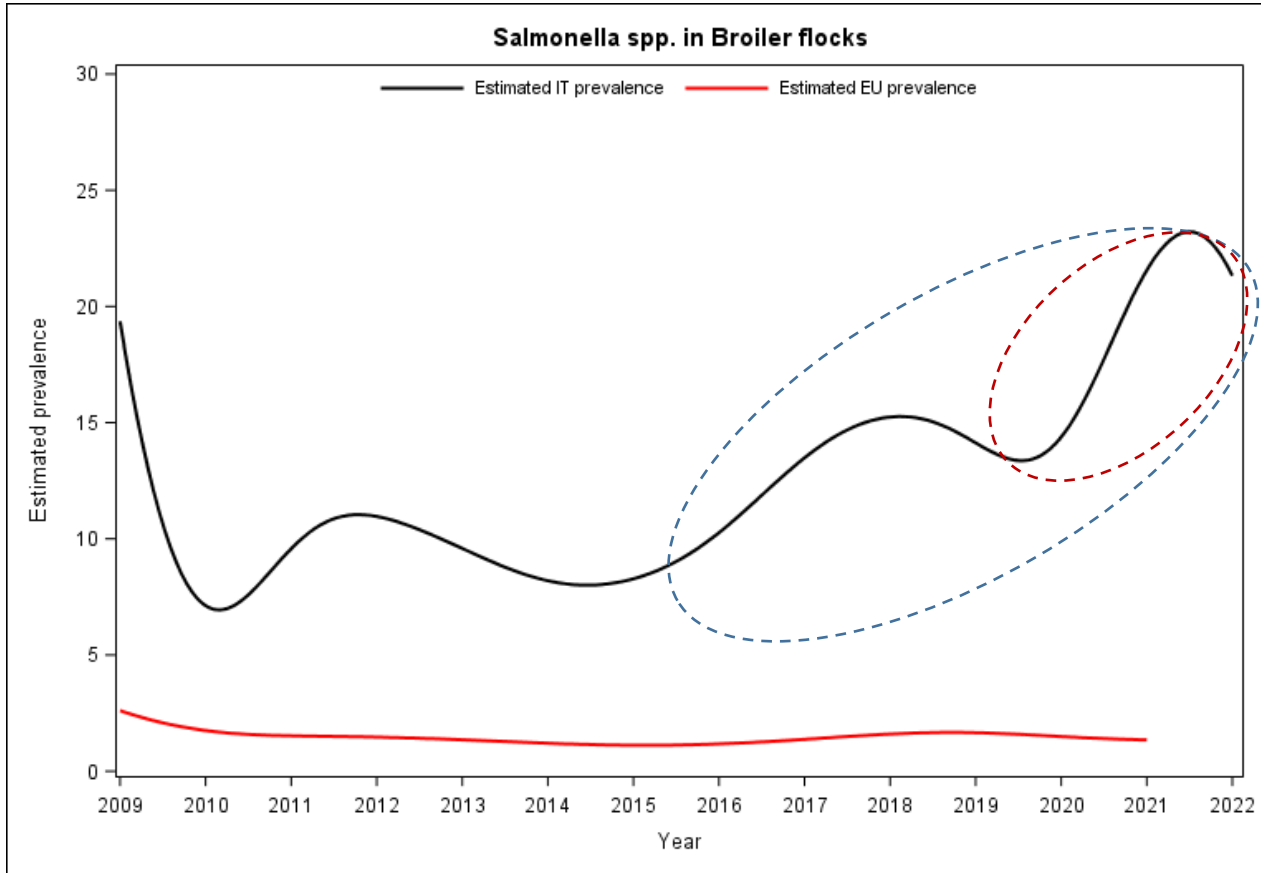




Stato dell'arte PNCS - Andamento sierotipi target EU - IT



Stato dell'arte PNCS - Andamento Salmonella spp. EU - IT



- 2009-2021, la prevalenza di *Salmonella* spp. IT è significativamente > EU
- Dal 2016 la prevalenza di *Salmonella* spp. in IT ha iniziato ad aumentare
- 3 anni: 2021 si è avuto un incremento repentino e significativo della prevalenza di *Salmonella* spp. in Italia rispetto al 2019-20 che si mantiene anche nel 2022

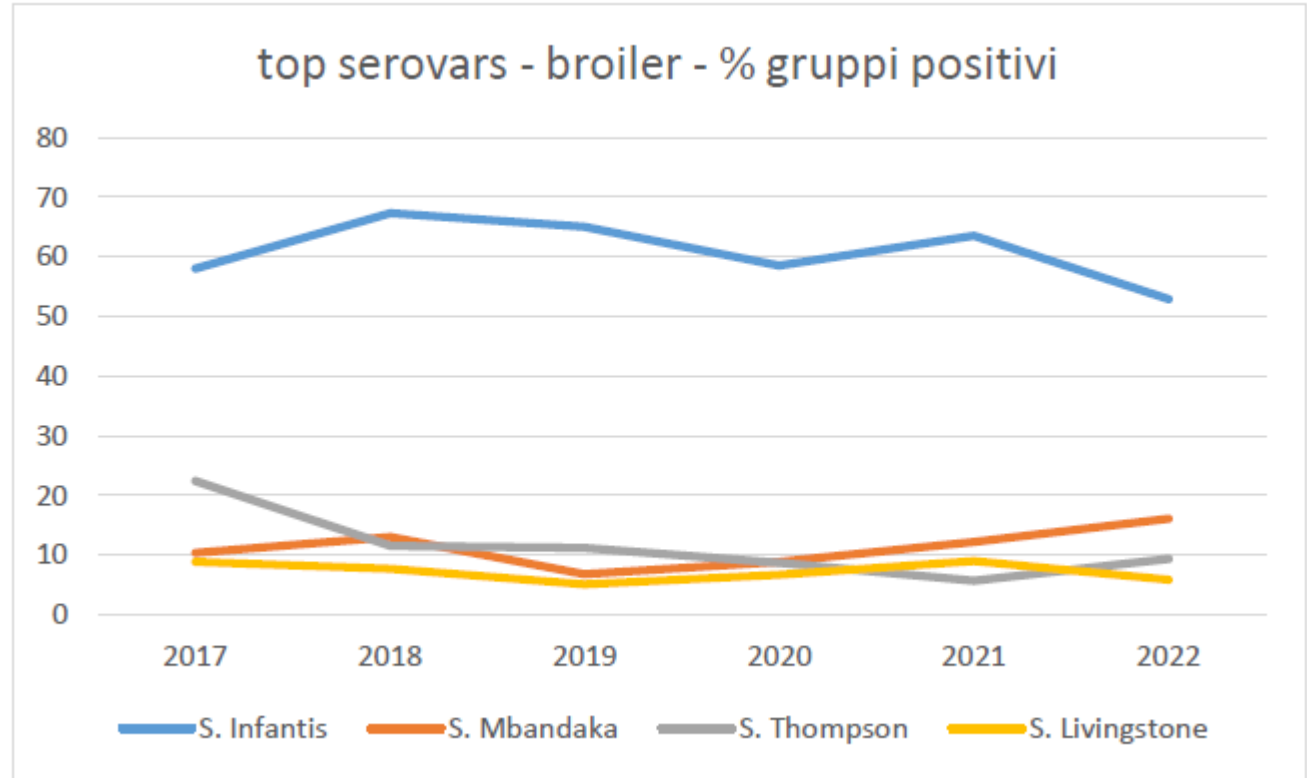
year	Est IT
2019	14.13
2020	14.38
2021	21.56
2022	21.33



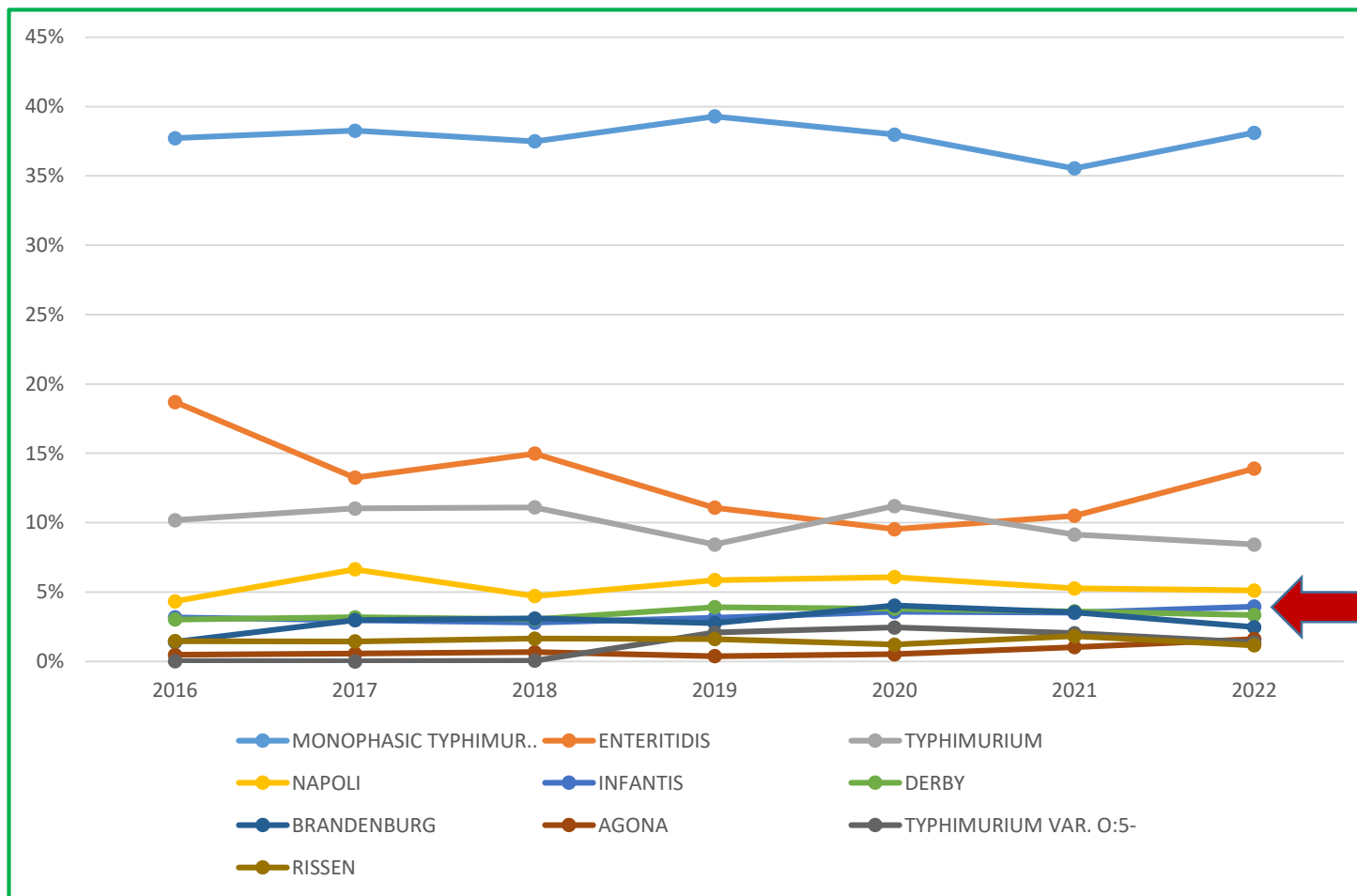
Sierotipi

• POLLI DA CARNE

ANNO	INFANTIS		LIVINGSTONE		MBANDAKA		THOMPSON	
	N	%	N	%	N	%	N	%
2021	3884	63.47%	554	9.05%	748	12.22%	347	5.67%
2020	2120	58.64%	241	6.67%	320	8.85%	315	8.71%
2019	2370	65.11%	187	5.14%	247	6.79%	408	11.21%
2018	1846	67.35%	211	7.70%	360	13.13%	317	11.57%
2017	1668	58.10%	253	8.81%	299	10.41%	643	22.40%



Sierotipi isolati dall'uomo (top 10)

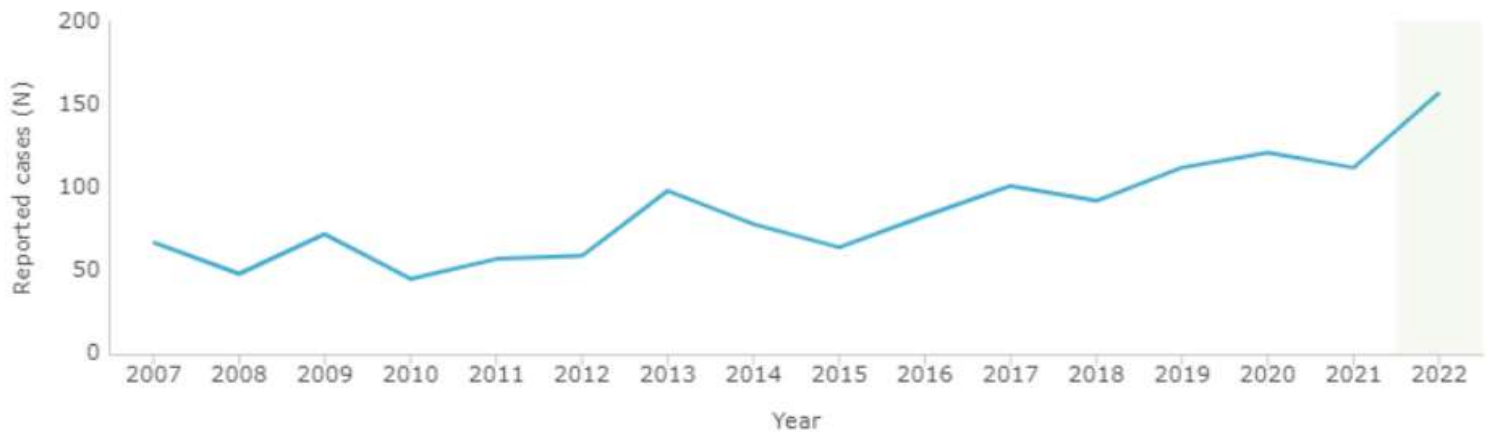




Surveillance Atlas of Infectious Diseases

← → Salmonellosis ▼ Disease surveillance ▼ Serotype INFANTIS ▼ Reported cases ▼ ▶ ◀◀ 2022 ▼ ▶▶ ⋮

Region	Reported cases (N)
EU (without UK)	1181
EU (with UK until 2019)	1181
EU/EEA (without UK)	1193
EU/EEA (with UK until 2019)	1193
Austria	60
Belgium	36
Bulgaria	3
Croatia	8
Cyprus	2
Czechia	76
Denmark	22



Caratteristiche di resistenza degli isolati da broiler - 2020

Table 34: Occurrence of resistance (%) to selected antimicrobials, using harmonised ECOFFs, complete susceptibility and multiresistance to all antimicrobials tested and co-resistance to (fluoro)quinolones and third-generation cephalosporins, in *S. Infantis*, from broiler flocks, 16 MSs and 1 MS, 2020

Country	N	GEN (%)	CHL (%)	AMP (%)	CTX (%)	CAZ (%)	MEM (%)	TGC (%)	NAL (%)	CIP (%)	AZM (%)	COL (%)	SMX (%)	TMP (%)	TET (%)	CS	MDR	Resistance to both CIP/CTX, applying ECOFFs	Resistance to both CIP/CTX, applying CBPs
Austria	122	0	0	0	0	0	0	0.8	98.4	98.4	0	0	95.9	0	96.7	1.6	95.9	0	0
Belgium	34	0	5.9	73.5	0	0	0	2.9	88.2	88.2	2.9	0	91.2	73.5	73.5	2.9	88.2	0	0
Croatia	43	0	0	18.6	0	0	0	0	88.4	88.4	0	0	16.3	2.3	14.0	11.6	16.3	0	0
Cyprus ^(a)	3	0	0	0	0	0	0	0	66.7	66.7	0	0	100	66.7	100	0	100	0	0
Czechia ^(a)	7	0	0	42.9	0	0	0	0	100	100	0	0	85.7	0	85.7	0	85.7	0	0
Finland ^(a)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
France ^(a)	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
Greece ^(a)	4	0	0	0	0	0	0	0	100	100	25.0	0	100	25.0	100	0	100	0	0
Hungary	132	0.8	0	12.9	0.8	2.3	0	4.5	100	100	2.3	0.8	75.0	0	77.3	0	75.0	0.8	0
Italy	140	1.4	13.6	47.1	20.7	20.0	0	0	93.6	94.3	1.4	1.4	83.6	69.3	78.6	5.0	87.1	20.7	0
Malta ^(a)	4	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	75.0	0	75.0	0	0
Poland	67	0	0	41.8	0	0	0	0	100	100	6.0	1.5	97.0	9.0	92.5	0	97.0	0	0
Romania	41	0	0	2.4	0	0	0	2.4	100	100	0	0	97.6	4.9	97.6	0	97.6	0	0
Slovakia	19	0	0	78.9	0	0	0	0	100	100	0	0	94.7	0	94.7	0	94.7	0	0
Slovenia	109	0	0	41.3	0	0	0	4.6	99.1	99.1	1.8	0	95.4	0	95.4	0.9	95.4	0	0
Spain	47	0	2.1	0	0	0	0	0	83.0	83.0	0	0	74.5	59.6	74.5	17.0	74.5	0	0
Total (16 MSs)	777	0.4	2.8	26.8	3.9	4.0	0	1.8	95.5	95.6	1.7	0.5	83.7	20.8	81.9	3.7	84.0	3.9	0
Median	-	0	0	7.7	0	0	0	0	98.7	98.7	0	0	93.0	1.2	82.1	0.5	87.7	0	0
Iceland	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
Total (16 MSs and 1 non-MSs)	778	0.4	2.8	26.7	3.9	4.0	0	1.8	95.4	95.5	1.7	0.5	83.5	20.8	81.7	3.9	83.9	3.9	0
Median	-	0	0	2.4	0	0	0	0	98.4	98.4	0	0	91.2	0	78.6	0.9	87.1	0	0

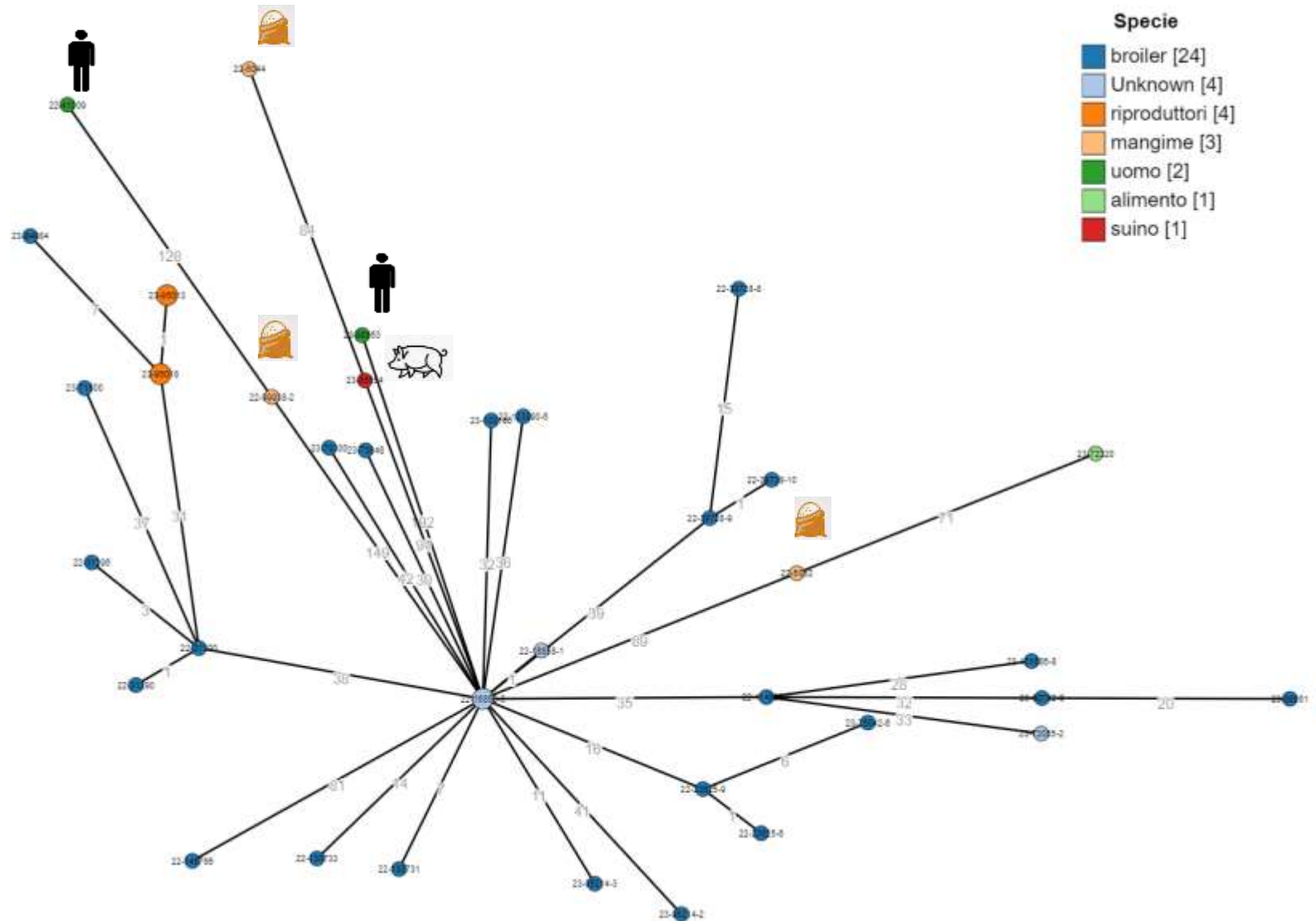
N: total number of isolates tested; %: percentage of isolates with this phenotype from the total tested; GEN: gentamicin; CHL: chloramphenicol; AMP: ampicillin; CTX: cefotaxime; CAZ: Ceftazidime; MEM: meropenem; TGC: tigecycline, NAL: nalidixic acid; CIP: ciprofloxacin; AZM: azithromycin; COL: colistin; SMX: sulfamethoxazole; TMP: trimethoprim; TET: tetracycline.

CS: percentage of isolates showing complete susceptibility to all antimicrobial classes of the harmonised set for *Salmonella* spp; MDR: percentage of isolates showing resistance to at least 3 antimicrobial classes of the harmonised set for *Escherichia coli*

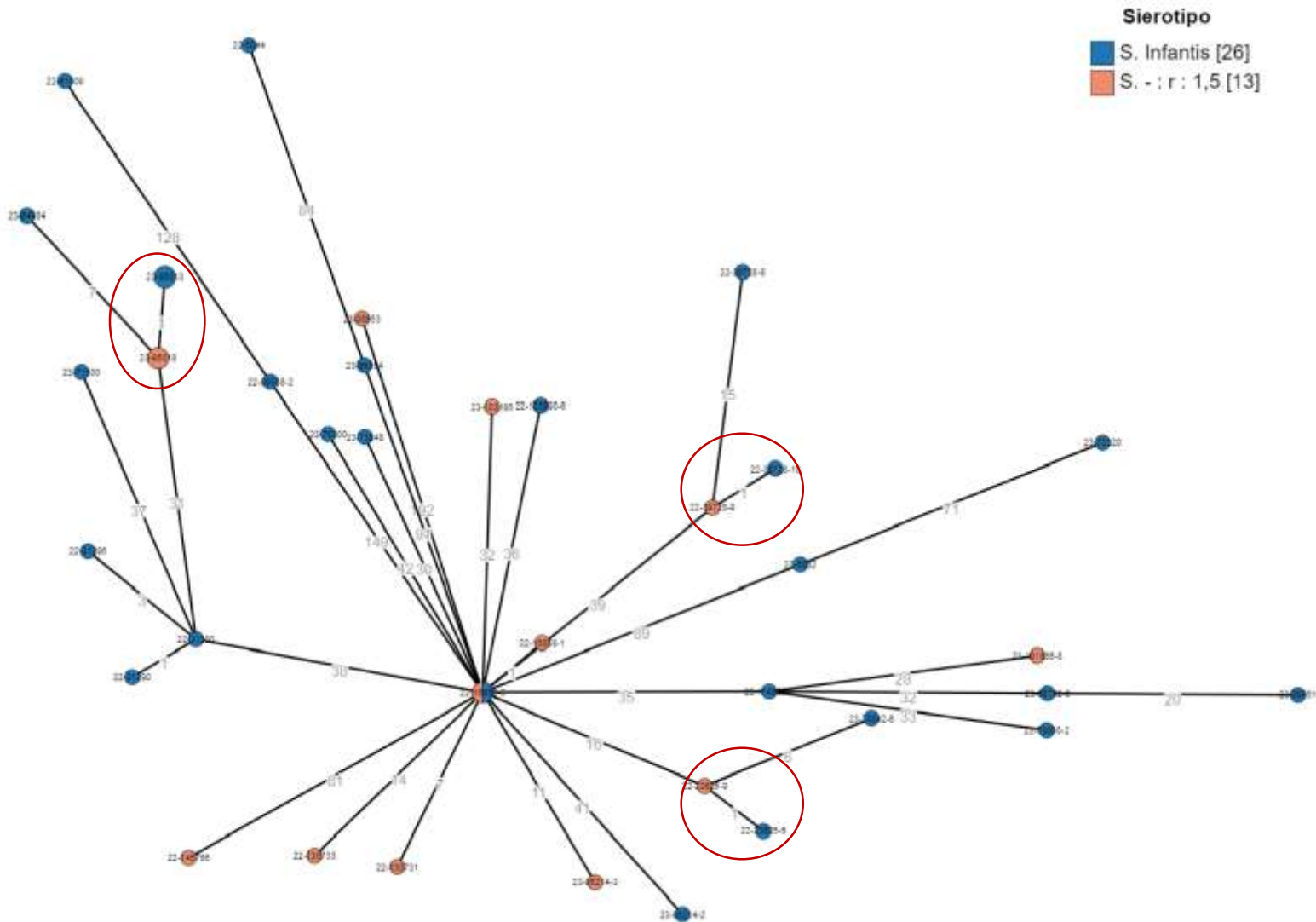
MSs: Member States; ECOFFs: epidemiological cut-off values; CBPs: clinical breakpoints

(a): The occurrence of resistance is assessed on less than 10 isolates and should only be considered as part of the total of MSs data and/or the total of MSs and non-MSs.

S. Infantis

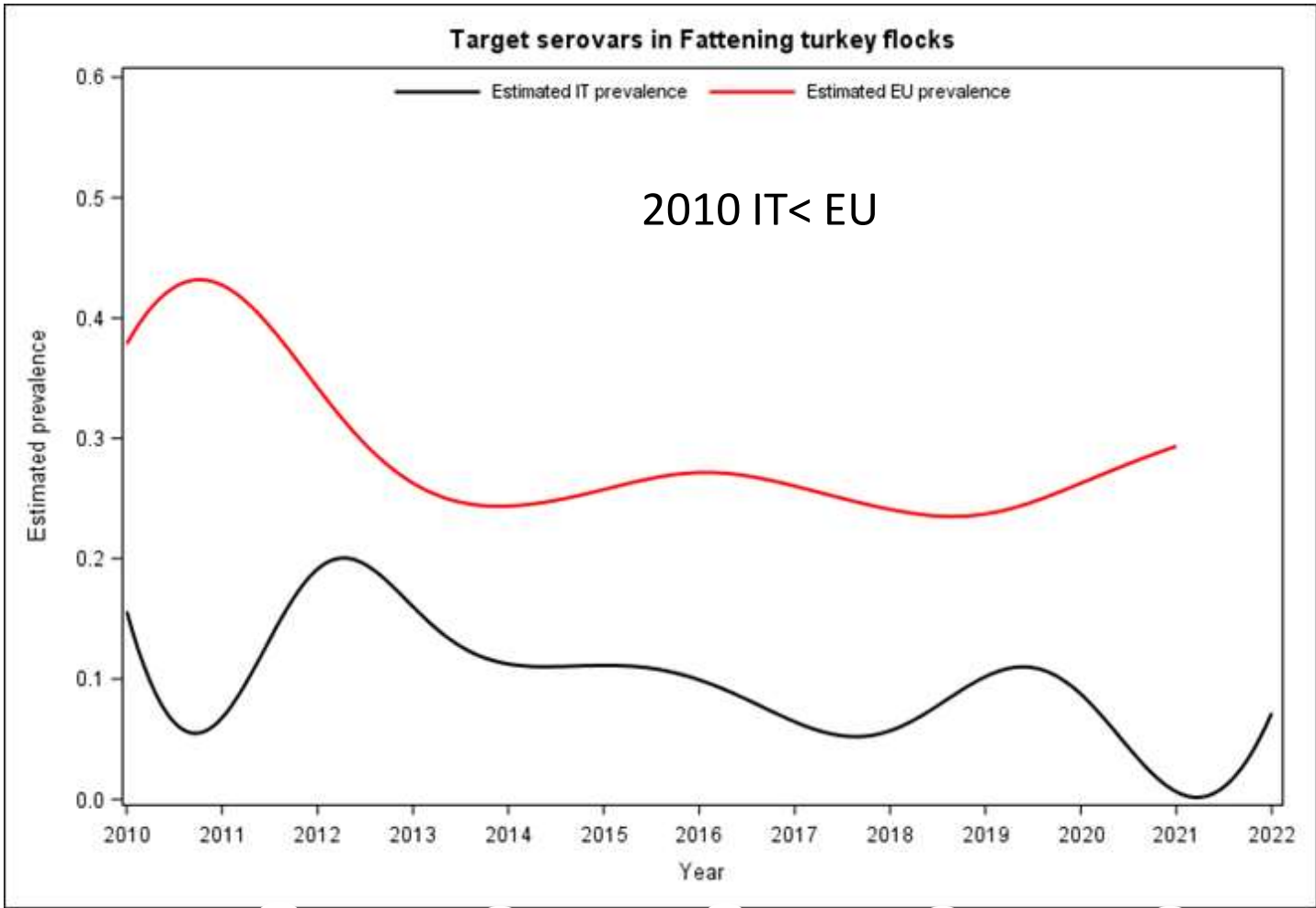


Nuova variante di S. Infantis?

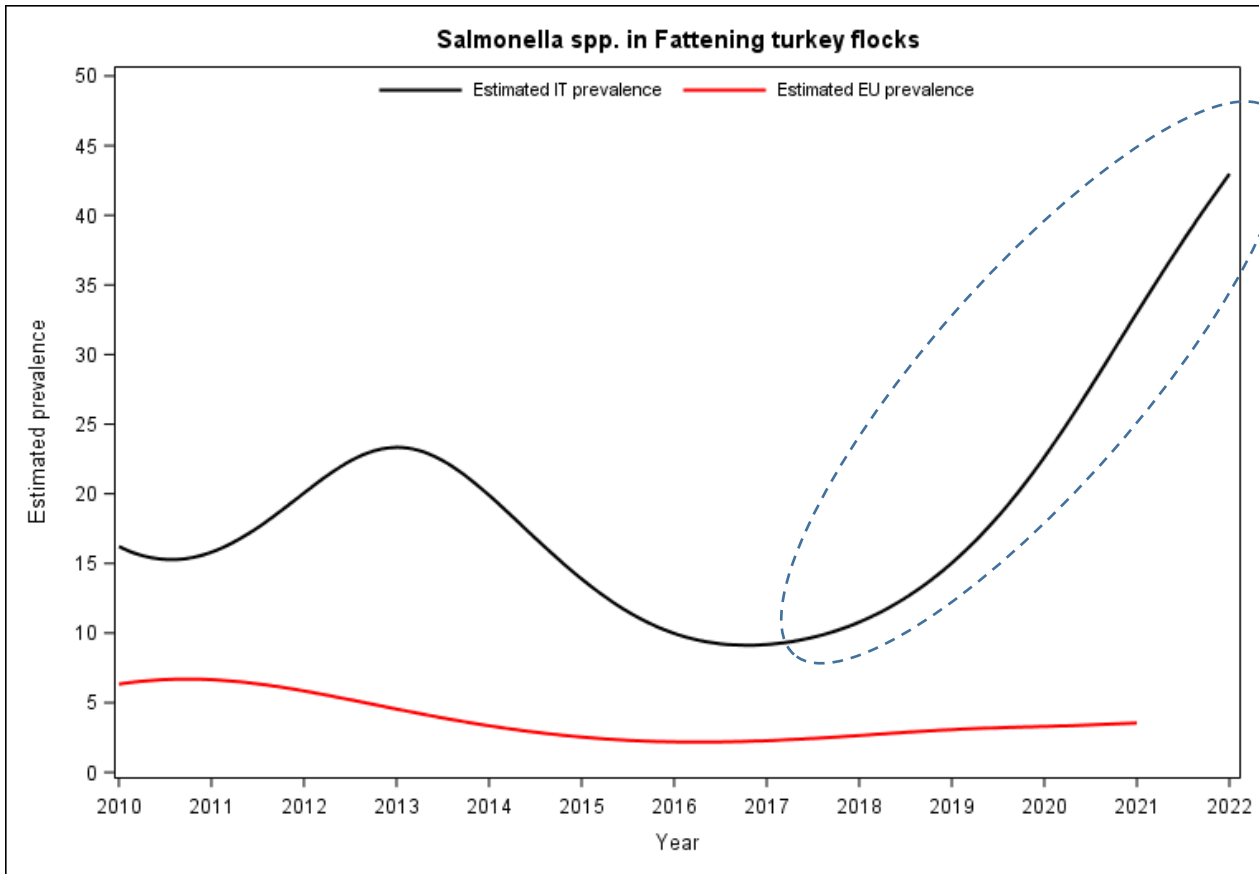




Stato dell'arte PNCS - Andamento sierotipi target EU - IT



Stato dell'arte PNCS - Andamento Salmonella spp. EU - IT



- Per tutto il periodo di osservazione, 2010-2021, la prevalenza di *Salmonella* spp. IT significativamente superiore a quella EU
- Dal 2018 si ha un incremento significativo della prevalenza di *Salmonella* spp in Italia

year	Est IT
2017	9.18
2018	10.79
2019	15.03
2020	22.64
2021	32.99
2022	42.97

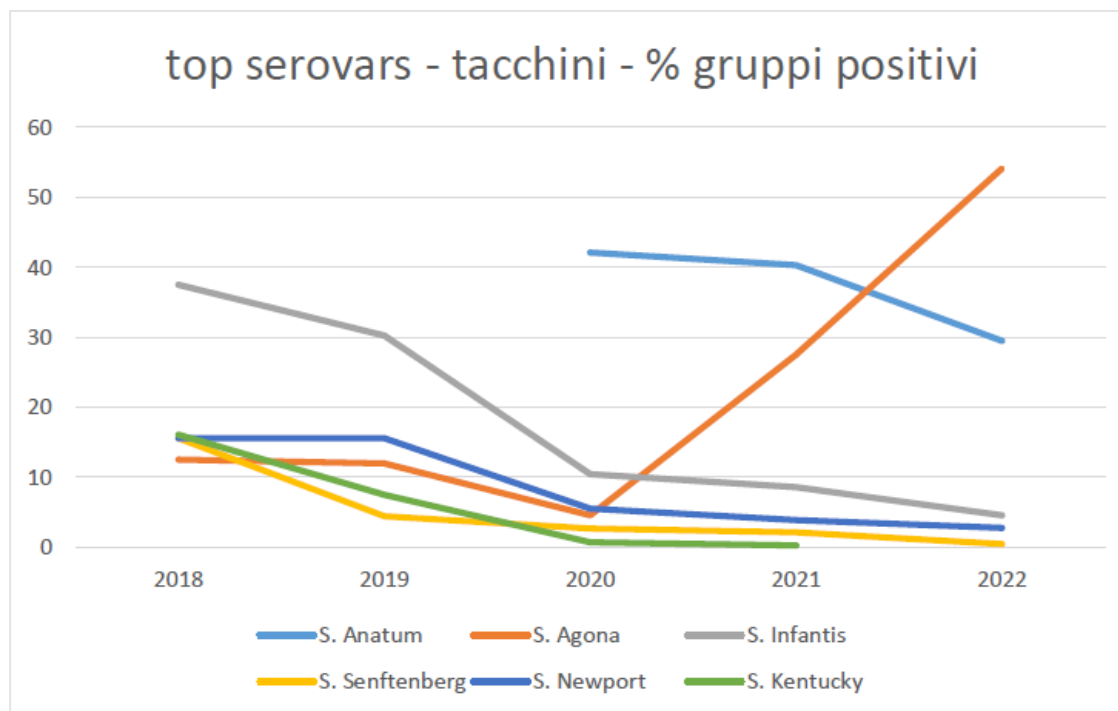


Sierotipi

• TACCHINI DA CARNE



ANNO	ANATUM		AGONA		INFANTIS		SENFTEMBERG		NEWPORT		KENTUCKY	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
2021	765	40.33%	522	27.52%	163	8.59%	41	2.16%	75	3.95%	5	0.26%
2020	518	42.15%	57	4.64%	129	10.50%	33	2.69%	69	5.61%	9	0.73%
2019	\	\	53	11.99%	134	30.32%	20	4.52%	69	15.61%	33	7.47%
2018	\	\	45	12.50%	135	37.50%	56	15.56%	56	15.56%	58	16.11%



Region	Reported cases (N)
EU (without UK)	150
EU (with UK until 2019)	150
EU/EEA (without UK)	151
EU/EEA (with UK until 2019)	151
Austria	3
Belgium	1
Bulgaria	-
Croatia	0
Cyprus	0
Czechia	1
Denmark	2

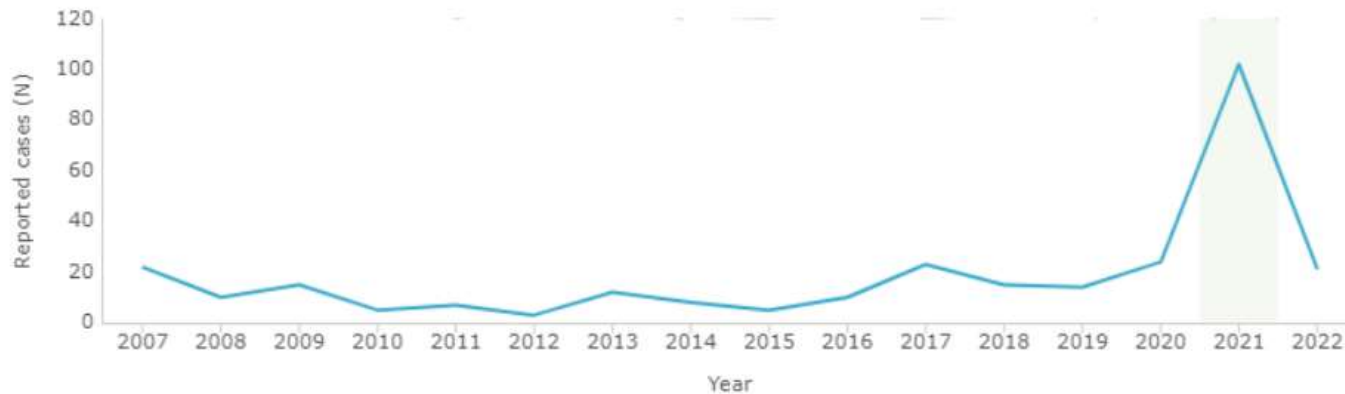


2021

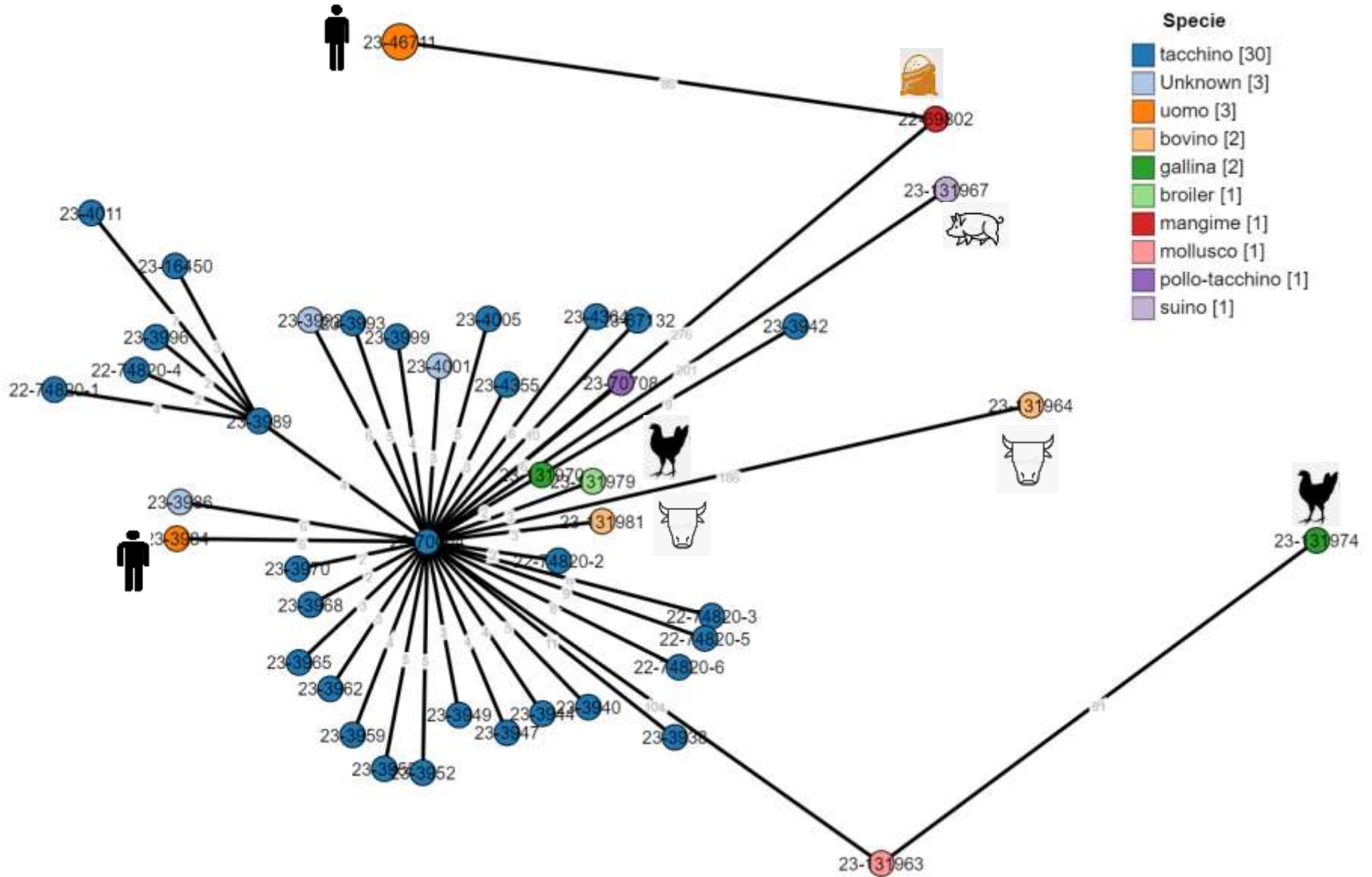
Region	Reported cases (N)
EU (without UK)	87
EU (with UK until 2019)	87
EU/EEA (without UK)	88
EU/EEA (with UK until 2019)	88
Austria	2
Belgium	2
Bulgaria	0
Croatia	0
Cyprus	0
Czechia	5
Denmark	3



2022



● Isolati S. Anatum – selezione 2022-2023





Situazione nell'uomo

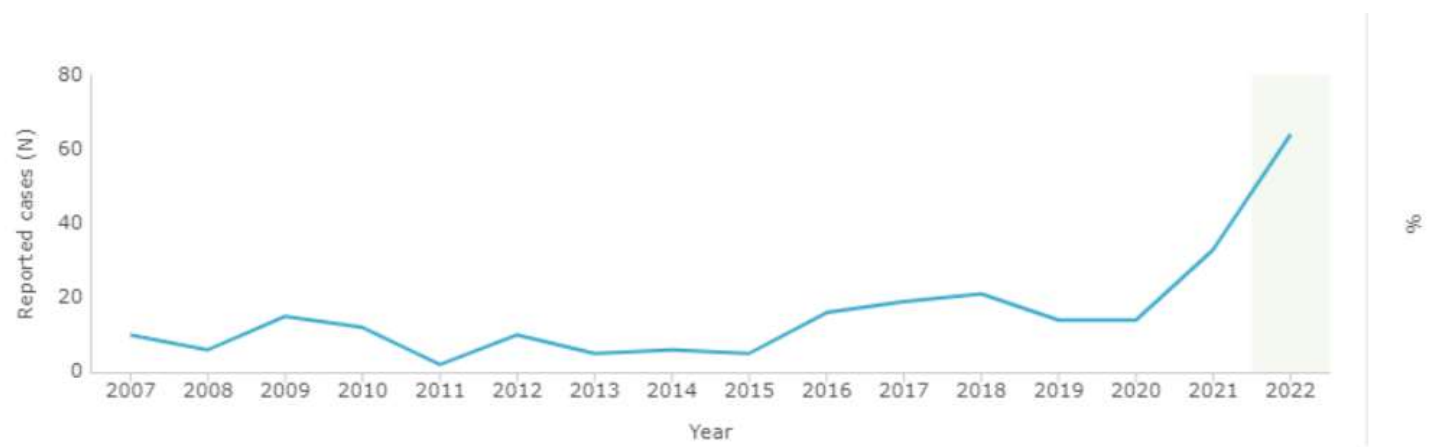
S. Agona



Surveillance Atlas of Infectious Diseases

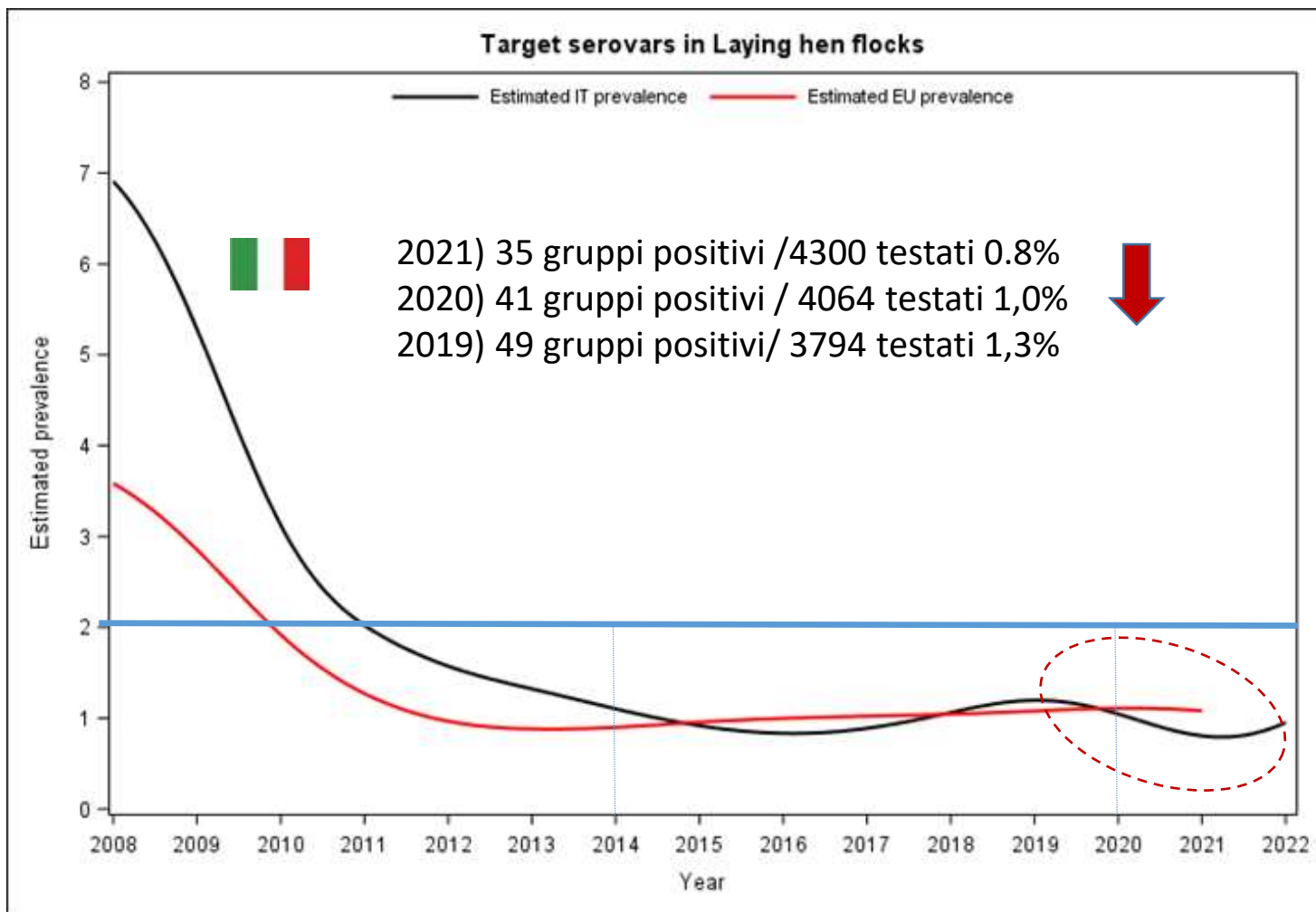
← → Salmonellosis ▾ Disease surveillance ▾ Serotype AGONA ▾ Reported cases ▾ ▶ ◀◀ 2022 ▾ ▶▶ ⋮

Region	Reported cases (N)
EU (without UK)	359
EU (with UK until 2019)	359
EU/EEA (without UK)	444
EU/EEA (with UK until 2019)	444
Austria	16
Belgium	14
Bulgaria	5
Croatia	2
Cyprus	0
Czechia	13
Denmark	12

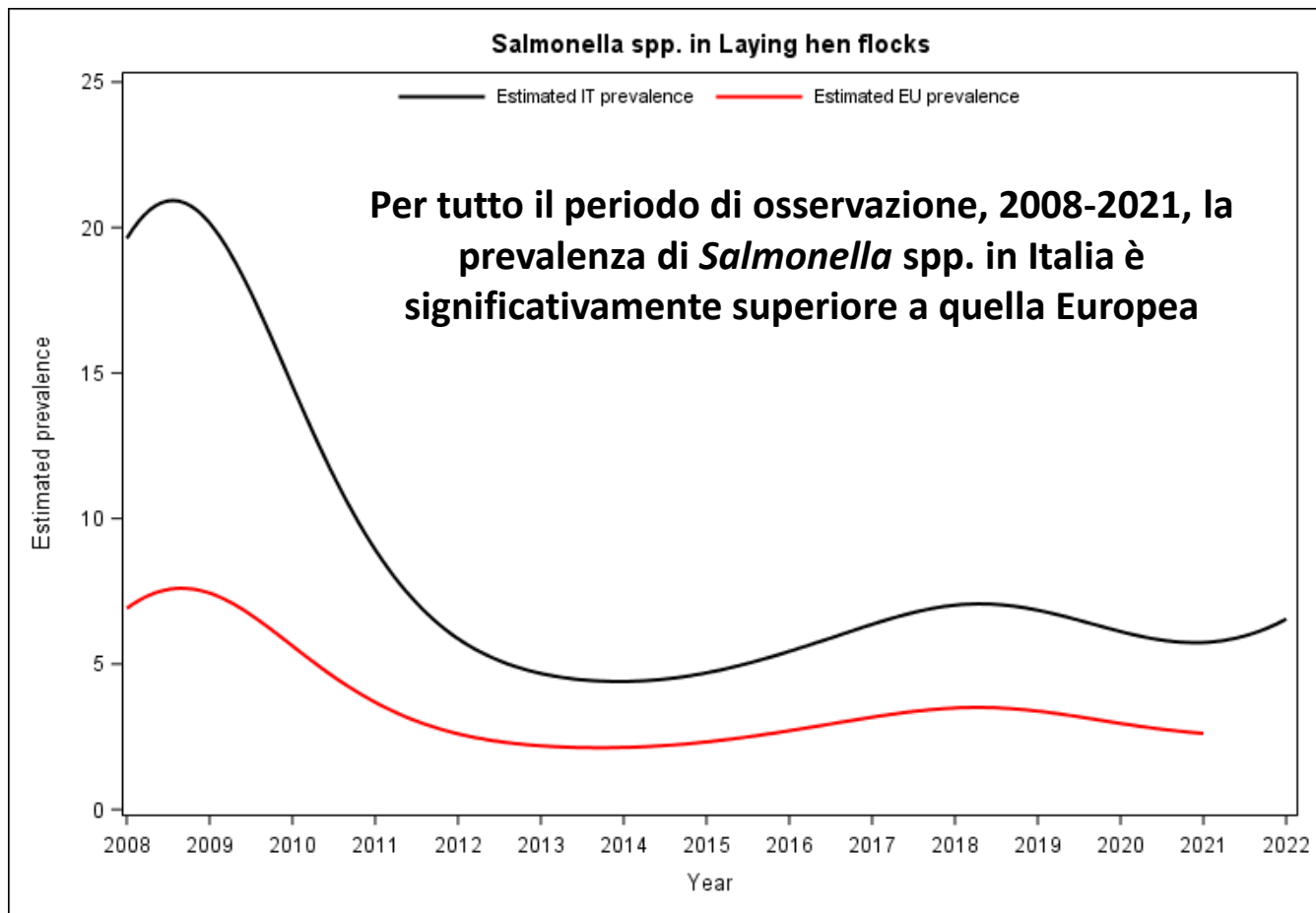




Stato dell'arte PNCS - Andamento sierotipi target EU - IT



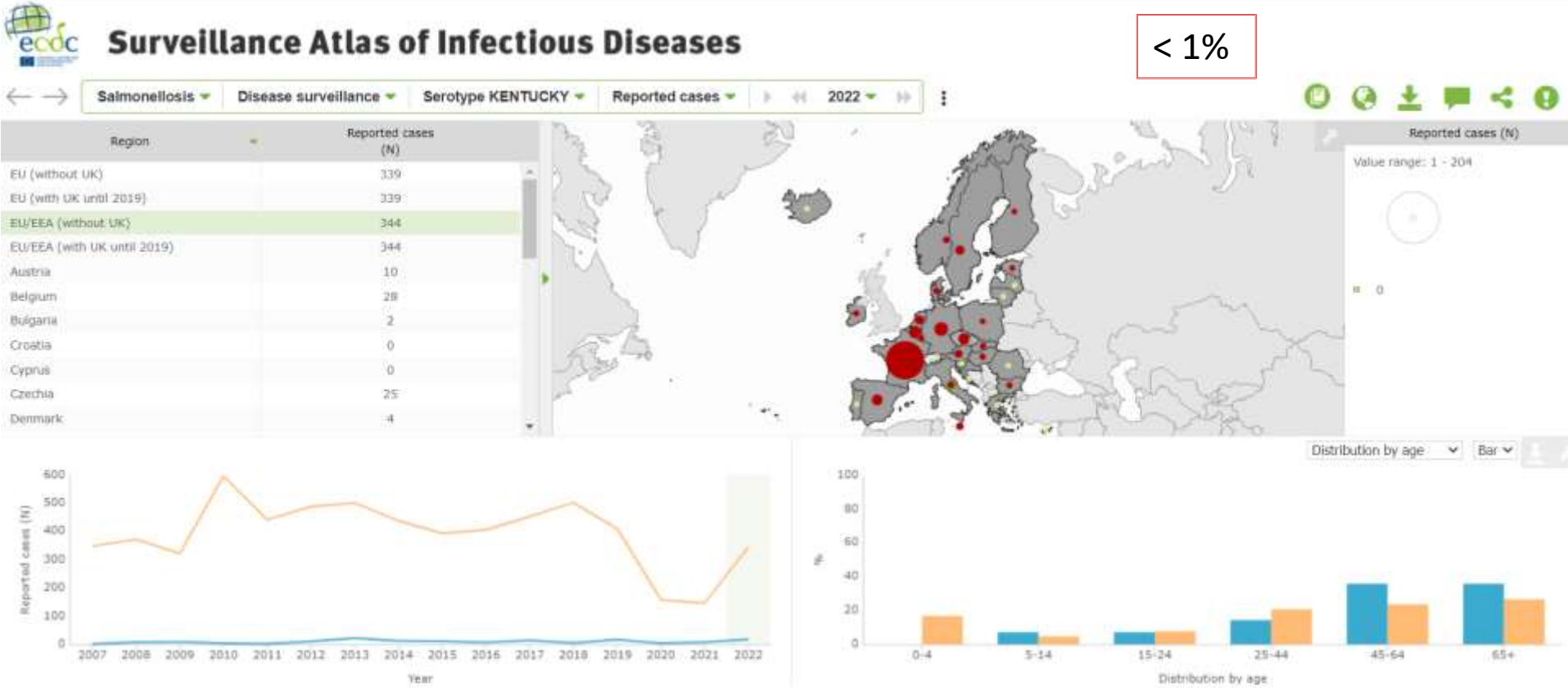
Stato dell'arte PNCS - Andamento Salmonella spp. EU - IT



Nel 2022 la prevalenza di *Salmonella* spp è significativamente superiore a quella stimata nei due anni precedenti (ATTENZIONE!!!!presto per parlare di trend)

year	Est IT
2020	6.12
2021	5.74
2022	6.55

S. Kentucky, situazione uomo (EU-IT)



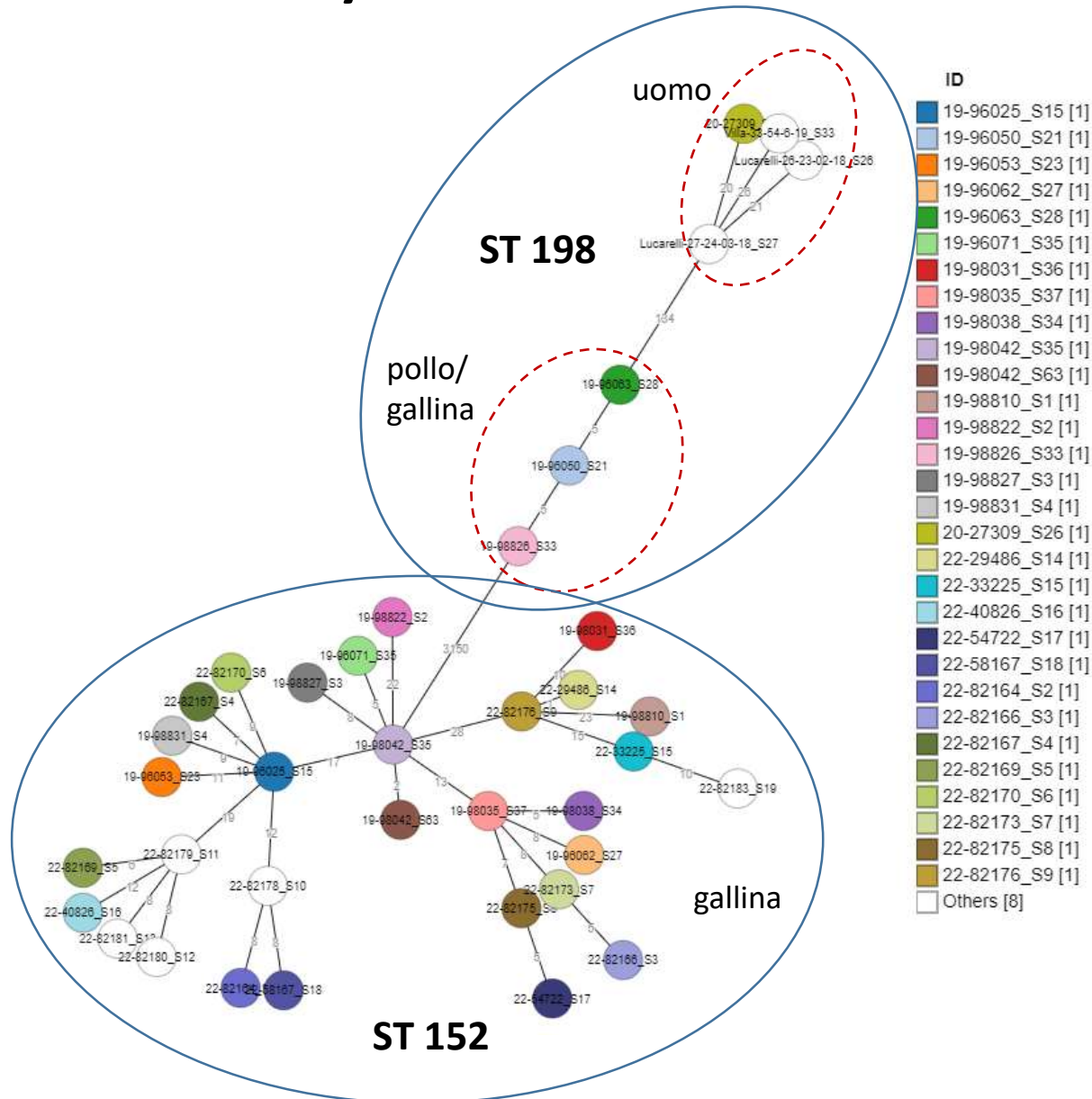
< 1%

● Indagine collezione isolati *S. Kentucky* (2018 – 2022)



Fonte	N° isolati	ST 198		ST 152	
Gallina	28	2	panS	26	ciprofloxacin I, nalidixic acid
Pollo	3	1	panS	2	ciprofloxacin I, nalidixic acid
Riproduttore	1			1	ampicillin, ciprofloxacin I/R, nalidixic acid, sulfisoxazole
Uomo	4	4	gentamicin, streptomycin, kanamycin, ciprofloxacin nalidixic acid, sulfisoxazole, tetracycline		
			gentamicin, streptomycin, ciprofloxacin , nalidixic acid, sulfisoxazole, tetracycline		
			gentamicin, streptomycin, chloramphenicol, ciprofloxacin , nalidixic acid, sulfisoxazole, tetracycline		
			gentamicin, streptomycin, ampicillin, ciprofloxacin , nalidixic acid, sulfisoxazole, tetracycline		

Salmonella Kentucky





- **Sorveglianza routinaria - cosa ci dicono i risultati del PNCS**

Sebbene per quanto concerne i sierotipi target come definiti dalla normativa corrente la situazione IT rimanga pienamente conforme, nelle diverse filiere vi sono 'sierotipi/cloni' che meritano di essere particolarmente attenzionati

- Sorveglianza dei focolaio di malattia alimentare

- Attività di ricerca

La sorveglianza delle zoonosi in EU

From Farm to Fork ... to bed !! gli attori



SCIENTIFIC REPORT

40000011 November 2023
 doi: 10.29358/4000011

The European Union One Health 2021 Zoonoses Report

European Food Safety Authority
 European Centre for Disease Prevention and Control

Abstract

The report of the European Food Safety Authority and the European Centre for Disease Prevention and Control presents the results of zoonoses monitoring and surveillance activities carried out in 2021. In 27 MSs, the United Kingdom (Northern Ireland) and nine non-MSs, key statistics on zoonoses and zoonotic agents in human, food, animals and food are provided and interpreted. Nationally, in 2021, the first six most reported zoonoses in humans were campylobacteriosis and salmonellosis, respectively. Cases of campylobacteriosis and salmonellosis increased in comparison with 2020, but decreased compared with previous years. In 2021, data collection and analysis of the EU level were still impacted by the COVID-19 pandemic and the control measures adopted in the MSs, including partial or total lockdowns. Sixteen MSs and the United Kingdom (Northern Ireland) achieved all the established targets in quality preparations for reduction in zoonoses prevalence for the relevant zoonoses. Salmonella samples from carcasses of various animal species and samples for Campylobacter qualification from broiler carcasses were more frequently positive when performed by the competent authorities than when non-chicks were considered. Yersinia was the first most reported zoonosis in humans, followed by Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and Listeria monocytogenes infections. L. monocytogenes and Yersinia spp. infections were the most severe zoonotic diseases, with the most hospitalizations and highest case fatality rates. Dengue, MSs reported more foodborne outbreaks and cases in 2021 than in 2020. S. enteritidis remained the most frequently reported

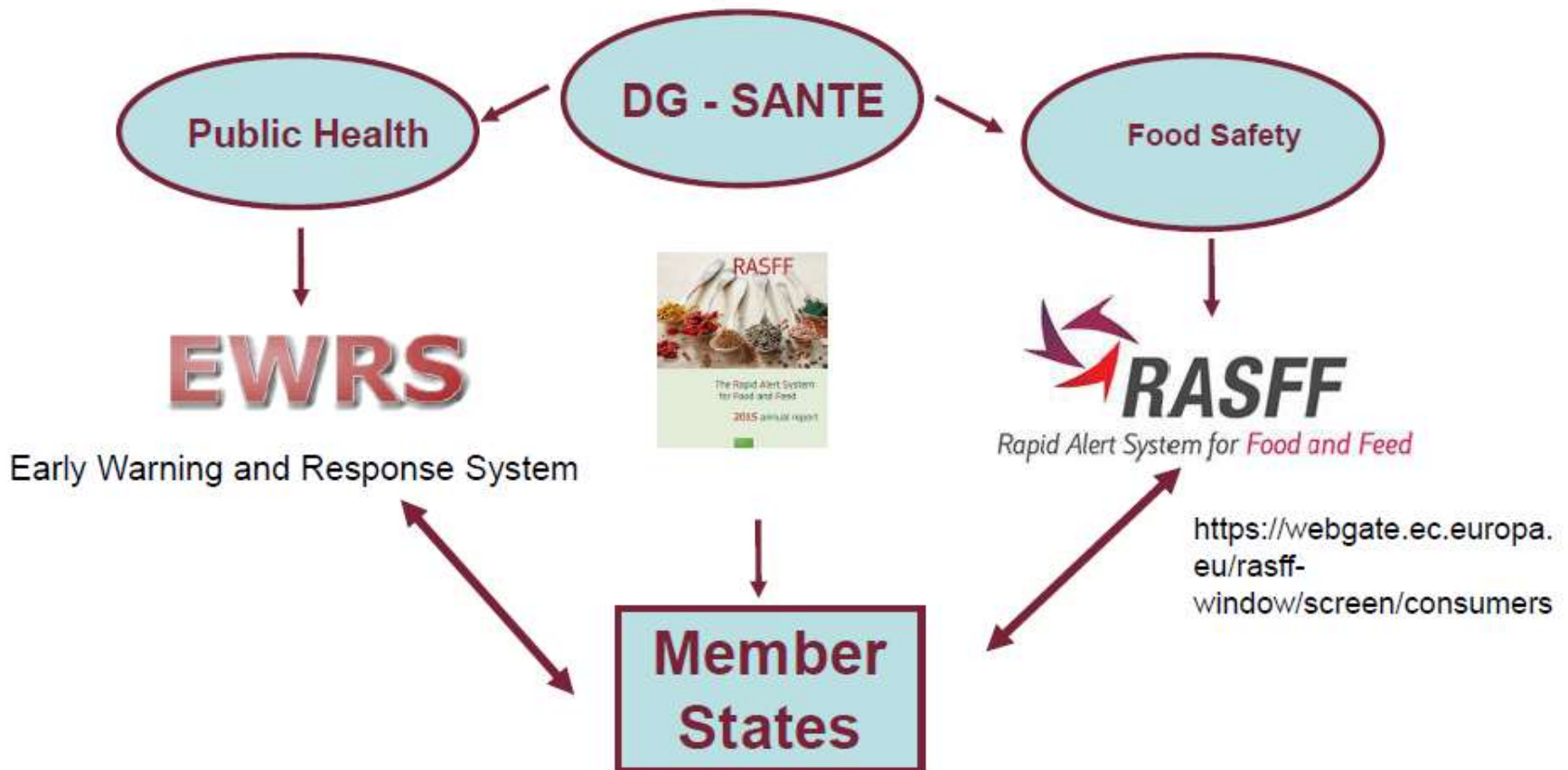
Sorveglianza
 clinica ed
 epidemiologica



Monitoraggio del
 rischio
 contaminazione



Sistemi di allerta e risposta rapida in EU



La Salmonella rispetto alle altre zoonosi



EU One Health Zoonoses Report 2021

Table 2: Reported hospitalisations and deaths due to zoonoses in confirmed human cases and among foodborne outbreak cases in the EU, 2021

Disease	Surveillance data on human cases (source: ECDC)											Foodborne outbreaks (FBO) (source: EFSA)							
	Confirmed human cases	Hospitalisation					Deaths					Outbreaks	Cases	Hospitalisations and proportion of hospitalised cases		Deaths and case fatality			
		Status available		Reporting MSs ^(b)	Cases and proportion of hospitalised cases		Outcome available		Reporting MSs ^(b)	Deaths and case fatality				N	N	N	%	N	%
		N	%		N	%	N	%		N	%								
Campylobacteriosis	127,840	45,121	35.3	15	10,469	23.2	91,177	71.3	16	26	0.03	249	1,051	134	12.7	6	0.6		
Salmonellosis	60,050	30,951	51.5	16	11,785	38.1	38,658	64.4	16	71	0.18	773	6,755	1,123	16.6	1	0.1		
Yersiniosis	6,789	1,564	23.0	13	508	32.5	3,596	53.0	21	0	0	21	125	14	11.2	0	0		
STEC infections	6,084	2,133	35.1	17	901	42.2	4,366	71.8	20	18	0.41	31	275	47	13.5	0	0		
Listeriosis	2,183	956	43.8	16	923	96.5	1,427	65.4	14	196	13.7	23	104	48	46.2	12	11.5		
Tularaemia	876	221	25.2	10	112	50.7	341	38.9	11	2	0.59	0	0	0	-	0	-		
Echinococcosis	529	121	22.9	13	51	42.1	270	51.0	16	0	0	0	0	0	-	0	-		
Q fever	460	NA	NA	NA	NA	NA	270	58.7	11	4	1.5	0	0	0	-	0	-		
Brucellosis	162	60	37.0	10	36	60.0	59	36.4	11	0	0	1	2	2	100	0	-		
West Nile virus infection ^(a)	152	83	54.6	6	70	84.3	152	100	8	11	7.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
Trichinellosis	77	26	33.8	6	10	38.5	28	36.4	6	0	0	1	2	0	100	0	-		
Rabies	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		

Data on congenital toxoplasmosis are not shown since 2021 data are not available yet.

MSs: Member States.

NA: Not applicable as the information is not collected for this disease.

(a): Total number of locally acquired infections (probable and confirmed cases).

EFSA, ECDC, 2022

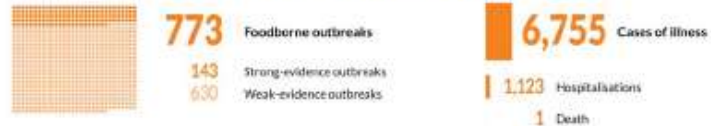
Salmonella in the EU, 2021

Human cases

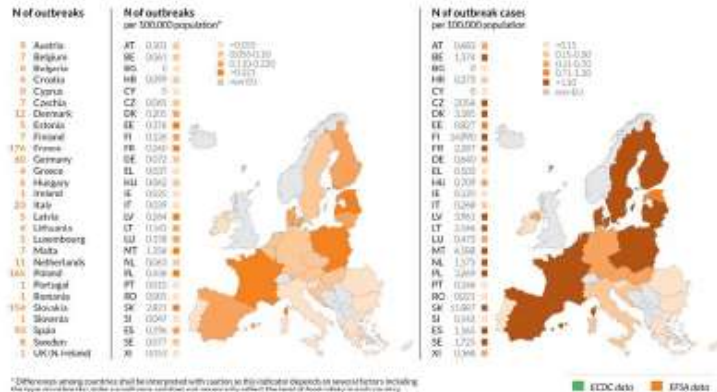
Notification rate (per 100,000 population) **15.7** Trend (2017-2021)



Human cases in foodborne outbreaks



Foodborne outbreaks



EFSA, ECDC, 2022

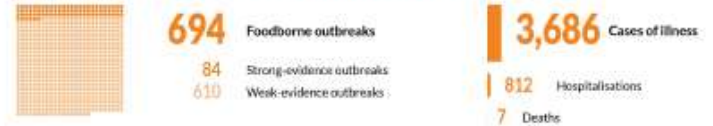
Salmonellosis

Human cases

Notification rate (per 100,000 population) **13.71** Trend (2019-2020)



Human cases in foodborne outbreaks



Foodborne outbreaks in the EU



EFSA, ECDC, 2021



JOINT ECDC-EFSA RAPID OUTBREAK ASSESSMENT

Three clusters of *Salmonella* Enteritidis ST11 infections linked to chicken meat and chicken meat products

26 October 2023

JOINT ECDC-EFSA RAPID OUTBREAK ASSESSMENT

Multi-country outbreak of *Salmonella* Mbandaka ST413, possibly linked to consumption of chicken meat in the EU/EEA, Israel and the UK

30 November 2022

JOINT ECDC-EFSA RAPID OUTBREAK ASSESSMENT

Multi-country outbreak of *Salmonella* Senftenberg ST14 infections, possibly linked to cherry-like tomatoes

27 July 2023

JOINT ECDC-EFSA RAPID OUTBREAK ASSESSMENT

Multi-country outbreak of monophasic *Salmonella* Typhimurium sequence type 34 linked to chocolate products – first update

18 May 2022

JOINT ECDC-EFSA RAPID OUTBREAK ASSESSMENT

Multi-country outbreak of *Salmonella* Virchow ST16 infections linked to the consumption of meat products containing chicken meat

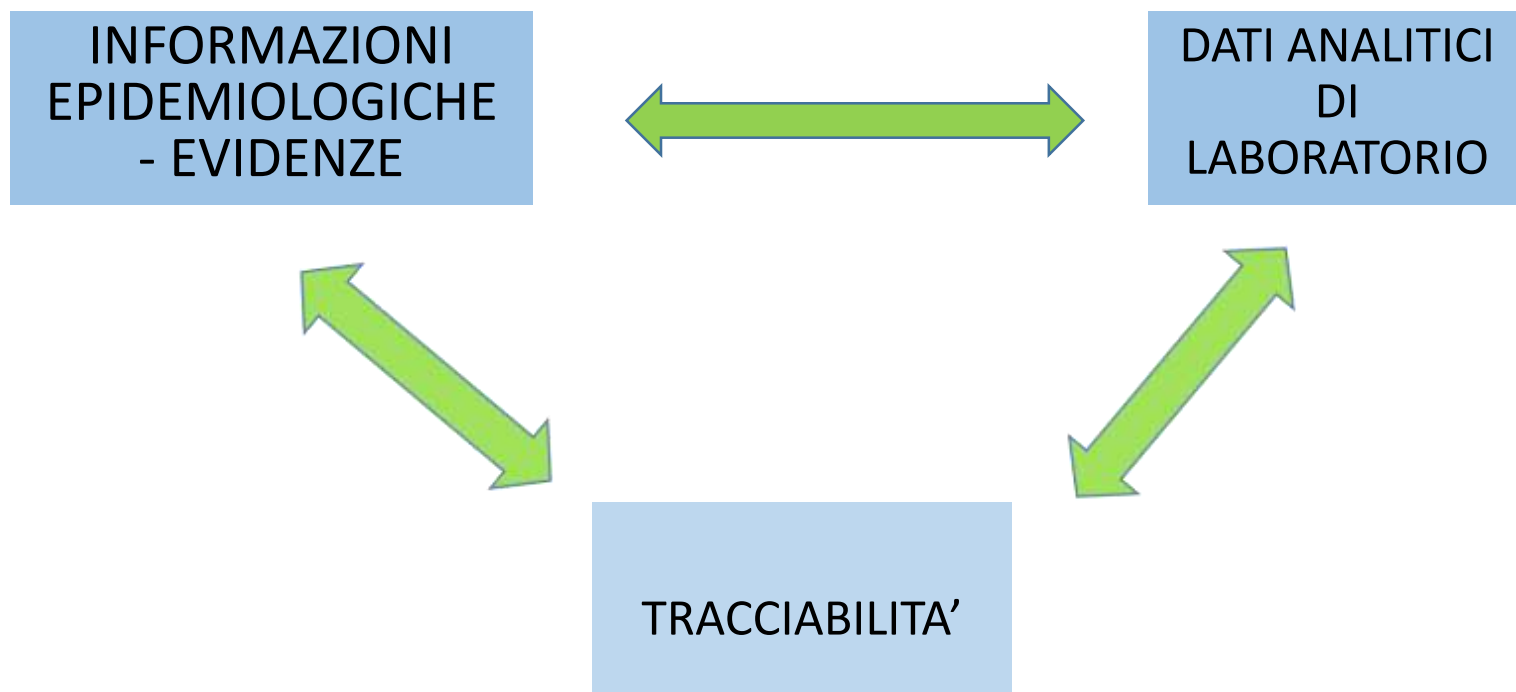
30 March 2023

JOINT ECDC-EFSA RAPID OUTBREAK ASSESSMENT

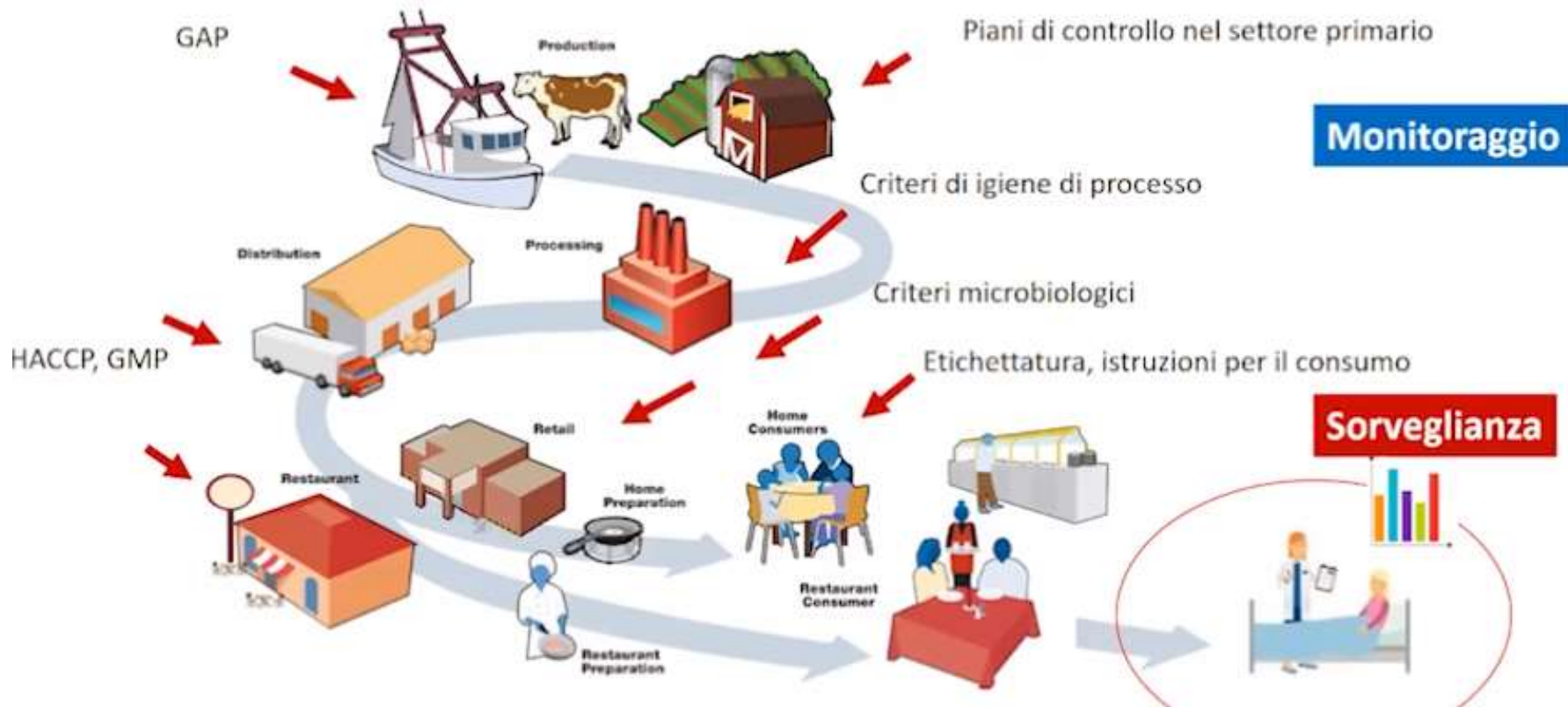
Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis sequence type (ST)11 infections linked to eggs and egg products

8 February 2022

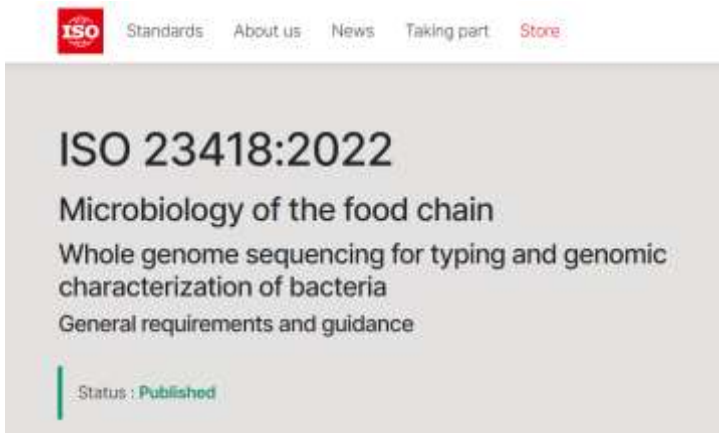
● Indagine sui focolai di malattia alimentare



Integrazione dei dati dalle differenti fonti – un esempio di applicazione di sorveglianza integrata One Health



WGS today!



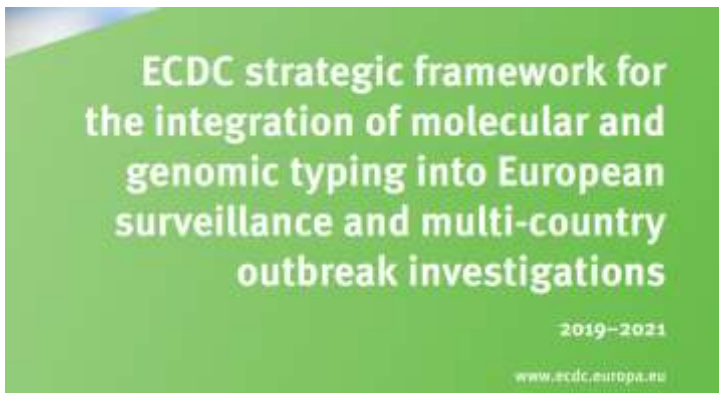
ISO
Standards About us News Taking part Store

ISO 23418:2022

Microbiology of the food chain

Whole genome sequencing for typing and genomic characterization of bacteria
General requirements and guidance

Status : **Published**



ECDC strategic framework for the integration of molecular and genomic typing into European surveillance and multi-country outbreak investigations

2019–2021

www.ecdc.europa.eu

TECHNICAL REPORT



APPROVED: 23 June 2022
doi:10.2903/jpefsa.2022.EN-7413

Guidelines for reporting Whole Genome Sequencing-based typing data through the EFSA One Health WGS System

European Food Safety Authority (EFSA),
Giancarlo Costa, Giulio Di Piazza, Perry Koevoets, Giovanni Iacono, Ernesto Liebana,
Luca Pasinato, Valentina Rizzi and Mirko Rossi



"Science Meets Policy" conference | EU initiatives towards the large-scale use of Next Generation Sequencing (NGS) to tackle foodborne threats

Parma (IT) and online | 5th-6th September 2023

The conference is co-organized with the European Commission's Inter-EURL working group on Whole Genome Sequencing (WGS).

5th September | One Health approaches and new standards for collecting, analysing and sharing of genomic data from food-borne pathogens to tackle food-borne threats



Challenges

Challenges of coordinating WGS for integrated food chain surveillance



ORGANIZATIONAL

- Legislation
- Regulations
- Silo working
- Infrastructure
- Funding
- Economical drivers
- Prioritization



CULTURAL

- Cross-sector and cross-border collaboration
- Political barriers
- Language barriers
- Resistance to change



TECHNICAL

- Data protection
- Meta-data format
- Data storage
- Data transfer
- Computing power
- Quality management



SCIENTIFIC

- Sequencing platform
- Bioinformatics tools
- Downstream approach
- Training and capacity
- Harmonizing results

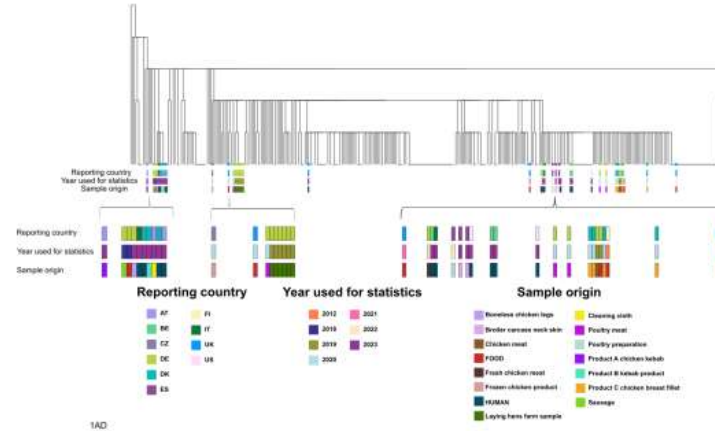


Focolaio in breve

- 335 casi di *S. Enteritidis* **ST11** (2 IT)
- **3 distinti cluster**
- Inizio giugno – fine ottobre 2023 (inizio giugno 1 focolaio segnalato dalla Danimarca, fine luglio secondo focolaio sempre dalla Danimarca – inizio agosto terzo focolaio segnalato da Austria)
- 14 Paesi europei (oltre 100 casi in Francia), Regno Unito (oltre 100 casi) e Stati Uniti
- 9 ospedalizzazioni - 1 decesso
- **Evidenze epidemiologiche riconducono al consumo di carne di pollo, in particolare kebab di pollo**
- 10 prodotti a base di carne di pollo (6 positivi per SE-ST11), collegati a sette produttori in Polonia e uno in Austria. Le **informazioni di tracciabilità suggeriscono l'esistenza di uno o più punti di contaminazione lungo la filiera**, sebbene la maggior parte dei campioni di pollo contaminati (2022 e 2023) provenivano dalla Polonia

Indagine sui focolai di malattia alimentare

Figure 8. Single linkage tree with 5 AD cut off of 363 *S. Enteritidis* ST11 sequences in the cluster 2 (2023-FWD-00045), including detailed information of 11 human isolates from 2023 and 30 non-human isolates

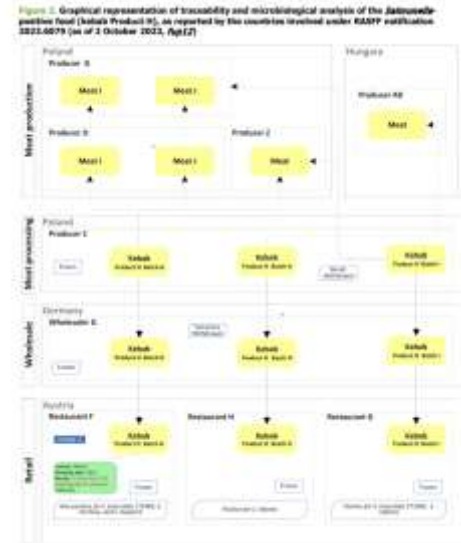


INFORMAZIONI
EPIDEMIOLOGICHE -
EVIDENZE

DATI ANALITICI
DI
LABORATORIO



TRACCIABILITA'



Casi umani in IT

JOINT ECDC-EFSA RAPID OUTBREAK ASSESSMENT

Three clusters of *Salmonella* Enteritidis ST11 infections linked to chicken meat and chicken meat products

26 October 2023

In **Italia**, sono stati riportati due casi correlati al consumo di carne di pollo (cluster 2) e uno dei due con dichiarato consume di kebab

Country	Total number of cases	Number of cases		Gender*		Age range years	Latest case**	Comments
		≤ 2022	2023	Male	Female			
Austria	6	NA***	6	6	0	7–75	July 2023 ^a	One case travelled to Czechia.
Belgium	10	7	3	5	5	3–79	August 2023	One case from 2023 reported travel history to Spain.
Denmark	27	0	24	15	12	9–98	September 2023	22 cases reported no travel, four cases with unknown travel. One case with travel to Croatia. 16/23 reported consumption of kebab/pizzas with chicken as a likely ingredient.
Finland	7	NA	7	6	1	18–83	July 2023 ^b	Three cases are domestic and four with unknown travel.
France	60	NA	60	33	27	<1–86	August 2023 ^a	27 isolates belong to HC2_352197 and 18 to HC2_61234 (Enterobase). All 60 isolates belong to HC5_1358 (Enterobase).
Germany	1	0	1	1	0	5–14	May 2023 ^c	
Ireland	12	11	1	3	8	4–68	July 2023	
Italy	2	NA	2	Unk	Unk	2–20	July 2023 ^b	One case was hospitalised. Both cases reported consumption of chicken meat (one as a kebab).
Netherlands	12	10	2	4	8	19–73	June 2023	Two cases from 2022 reported history of travel to Gran Canaria, Spain.
Norway	9	9	0	Unk	Unk	Unk	2022	One domestic case. Travel history to Spain for three cases and unknown for five cases.
Slovenia	3	3	0	1	2	21–50	2021	
Sweden	2	NA	2	2	0	29–37	July 2023 ^a	One case reported consumption of chicken kebab
Total EU/EEA	151	NA	108	76	63			
United Kingdom	83	NA	83	41	42	< 1–87	October 2023	14 cases reported foreign travel: 11 to EU countries, one on a cruise in the Mediterranean.
United States	1	0	1	0	1	< 25	June 2023 ^a	Travel history to Spain, reported consumption of chicken in Spain.
Total	235	NA	192	117	106			

Casi non-umani in IT

JOINT ECDC-EFSA RAPID OUTBREAK ASSESSMENT

Three clusters of *Salmonella* Enteritidis ST11 infections linked to chicken meat and chicken meat products

20 October 2023



Human isolates in the OH cluster*			Non-human isolates in the OH cluster
Cluster (No of human isolates)	Year range of isolates	Country (No of isolates)	
Cluster 1 (n = 4)	2022 - 2023	AT (1) PL (3)	<p>Nine isolates from:</p> <p>Three isolates from chicken kebab in AT in 2023, originating from PL (Product A, G and H).</p> <p>One isolate from poultry meat in DE in 2023.</p> <p>One isolate from chicken wings in BG in 2023.</p> <p>One isolate from chicken breast fillet in DE in 2022, originating from DE.</p> <p>One isolate from boneless chicken legs in DE in 2022, originating from PL.</p> <p>Two isolates from BE without epidemiological data.</p>
Cluster 2 (n = 266)	2012 - 2023	AT (1) BE (4) DE (2) DK (2) IE (8) IT (2) LU (1) NL (15) NO (5) PL (49) PT (1) SE (1) UK (173) US (2)	<p>30 isolates from:</p> <p>One isolate from a chicken kebab in AT in 2023, originating from PL (Product A).</p> <p>One isolate from a kebab product in DK in 2023, originating from PL (Product B).</p> <p>One isolate from a cleaning cloth in AT in 2023.</p> <p>One isolate from boneless chicken legs in DE in 2023, originating from DE.</p> <p>Two broiler carcass neck skin samples in ES in 2023</p> <p>One isolate from fresh poultry meat in DE in 2022.</p> <p>One isolate from a poultry preparation in ES in 2022, originating from DE.</p> <p>Three isolates from poultry meat in DE in 2020.</p> <p>One isolate from frozen chicken product in CZ in 2020, originating from PL.</p> <p>Four isolates from chicken breast fillets in DK in 2020, originating from PL.</p> <p>One isolate from chicken meat in DE in 2019.</p> <p>Six isolates from laying hens farms in DE in 2019.</p> <p>One isolate from sausage in DE in 2018.</p> <p>Six isolates from ENA** without epidemiological data.</p>
Cluster 3 (n = 20)	2014 - 2023	DK (3) FR (2) PL (3) UK (12)	<p>Five isolates from:</p> <p>One isolate from fresh chicken meat in DE in 2023.</p> <p>One isolate from mechanically separated poultry meat in IT in 2022, originating from PL.</p> <p>Two isolates from cattle in DE in 2020.</p> <p>One isolate food isolate from ENA without epidemiological data.</p>



- **Sorveglianza routinaria - cosa ci dicono i risultati del PNCS**

Sebbene per quanto concerne i sierotipi target come definiti dalla normativa corrente la situazione rimanga pienamente conforme nelle diverse filiere vi sono 'isolati' che meritano di essere particolarmente attenzionati

- **Sorveglianza dei focolai di malattia alimentare**

Il miglioramento degli strumenti diagnostici e dei relativi sistemi di sorveglianza nei differenti contesti rende molto più efficiente l'attuale sistema di identificazione degli outbreak nel panorama internazionale (con le ovvie conseguenze che ne derivano)

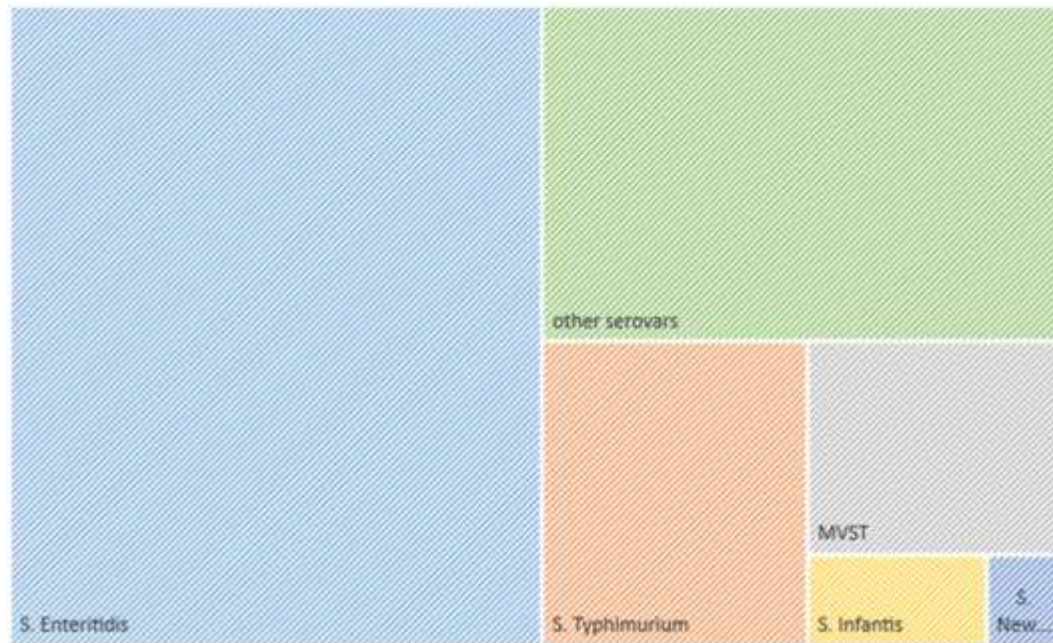
- **Attività di ricerca**

PRoSPECT: Predicting *Salmonella* Pathogenic Potential to Enhance Targeted Control Strategies

- Ricerca Finalizzata 2018
- **Individuare tratti genetici caratteristici (*signature*) per predire il potenziale patogenico di ceppi di *Salmonella* appartenenti a sierotipi con diverso impatto sulla salute pubblica**
- **Esplorare la possibilità di utilizzare combinazioni di marker diversi per predire la rilevanza di ceppi specifici di *Salmonella* per la salute pubblica**
 - Screening di nuovi elementi genetici potenzialmente coinvolti nei meccanismi di virulenza, invasività, persistenza e capacità di formare biofilm
 - Sviluppo di protocolli di saggi fenotipici, *in vitro*, per valutare persistenza, invasività e virulenza dei ceppi di *Salmonella*
 - Definizione di un criterio con cui classificare i ceppi di *Salmonella* con impatto sulla salute pubblica

● Numero di casi di salmonellosi in EU – 2019* – uomo

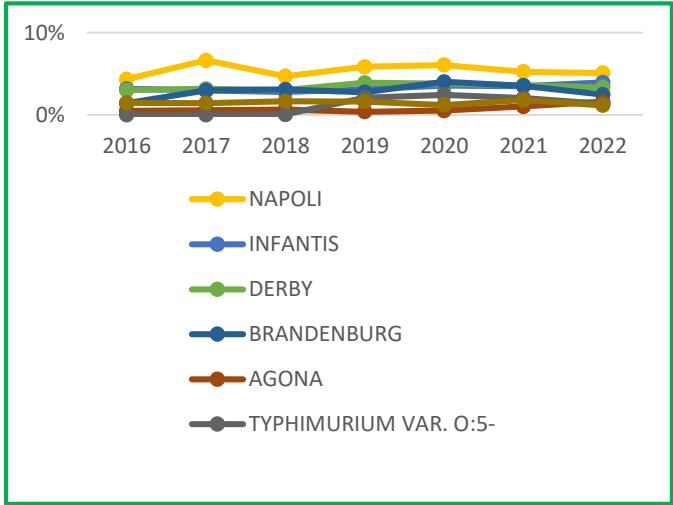
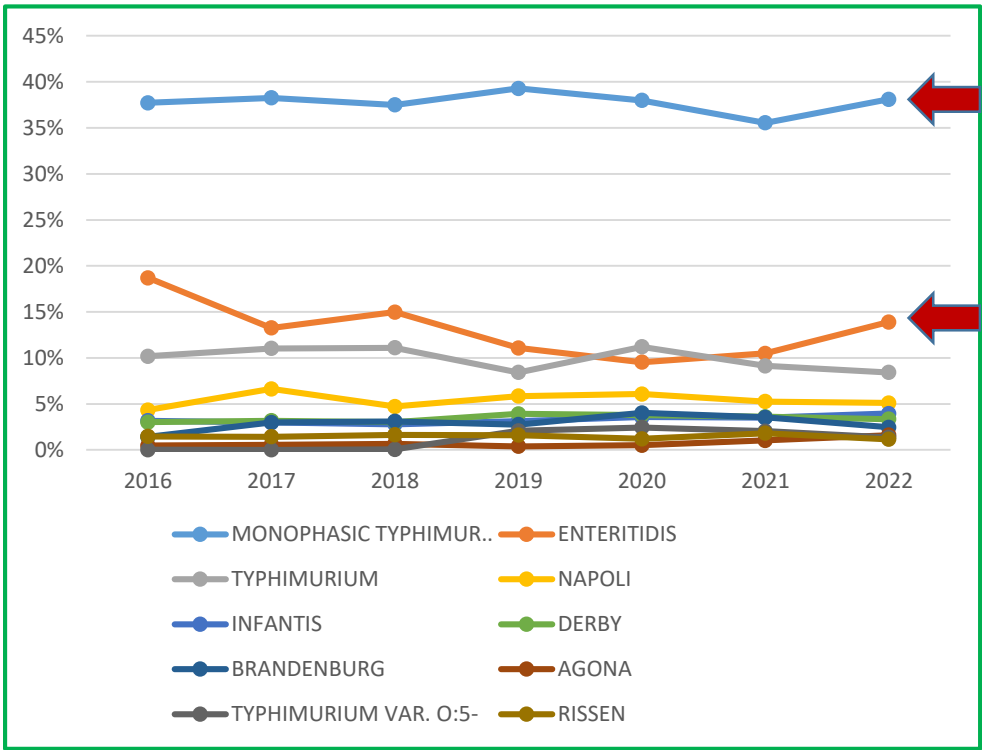
~**74%** dei casi di salmonellosi nell'uomo è causato da soli **cinque sierotipi**



*pre-COVID



Sierotipi isolati dall'uomo (top 10)



● Regolamento (EC) No 2160/2003 – drawbacks

**stretta dipendenza dalla
definizione di sierotipo**

Non tiene in considerazione il **potenziale patogenico reale** di un **ceppo** di *Salmonella* (che spesso è determinato da specifiche caratteristiche genetiche, **non correlate al sierotipo**)

Non tiene in considerazione **ceppi** di *Salmonella* potenzialmente ad **alta patogenicità** che **non appartengono ai sierotipi target**

Selezione dei sierotipi di *Salmonella* da includere nel progetto

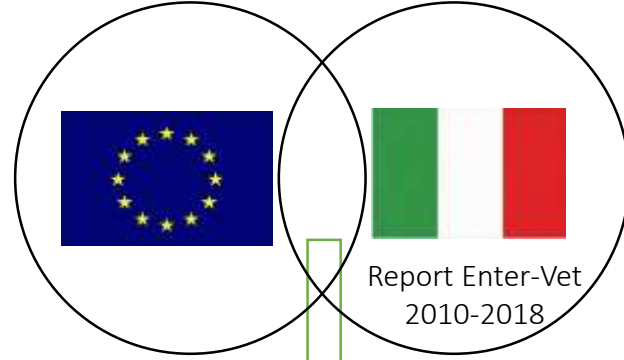


EFSA ed ECDC, 2019



Sierotipi isolati **frequentemente** in casi di infezioni umane – **SIEROTIPI CASO**

- S. Enteritidis
- Variante monofasica di S. Typhimurium (MVST)
- S. Typhimurium



Report Enter-Vet
2010-2018



Sierotipi isolati **meno frequentemente** in casi di infezioni umane – **SIEROTIPI CONTROLLO**

- S. Infantis
- S. Mbandaka
- S. Thompson
- S. Senftenberg
- S. Montevideo
- S. Dublin
- S. Livingstone
- S. Derby
- S. Kentucky
- S. Newport
- S. Rissen
- S. Hadar

Identificazione di popolazioni che condividono specifiche *features* genetiche

Sierotipi isolati **frequentemente** in casi di infezioni umane – **SIEROTIPI CASO**

- S. Enteritidis
- Variante monofasica di S. Typhimurium (MVST)
- S. Typhimurium

Sierotipi isolati **meno frequentemente** in casi di infezioni umane – **SIEROTIPI CONTROLLO**

- S. Infantis
- S. Mbandaka
- S. Thompson
- S. Senftenberg
- S. Montevideo
- S. Dublin
- S. Livingstone
- S. Derby
- S. Kentucky
- S. Newport
- S. Rissen
- S. Hadar

Materiali:

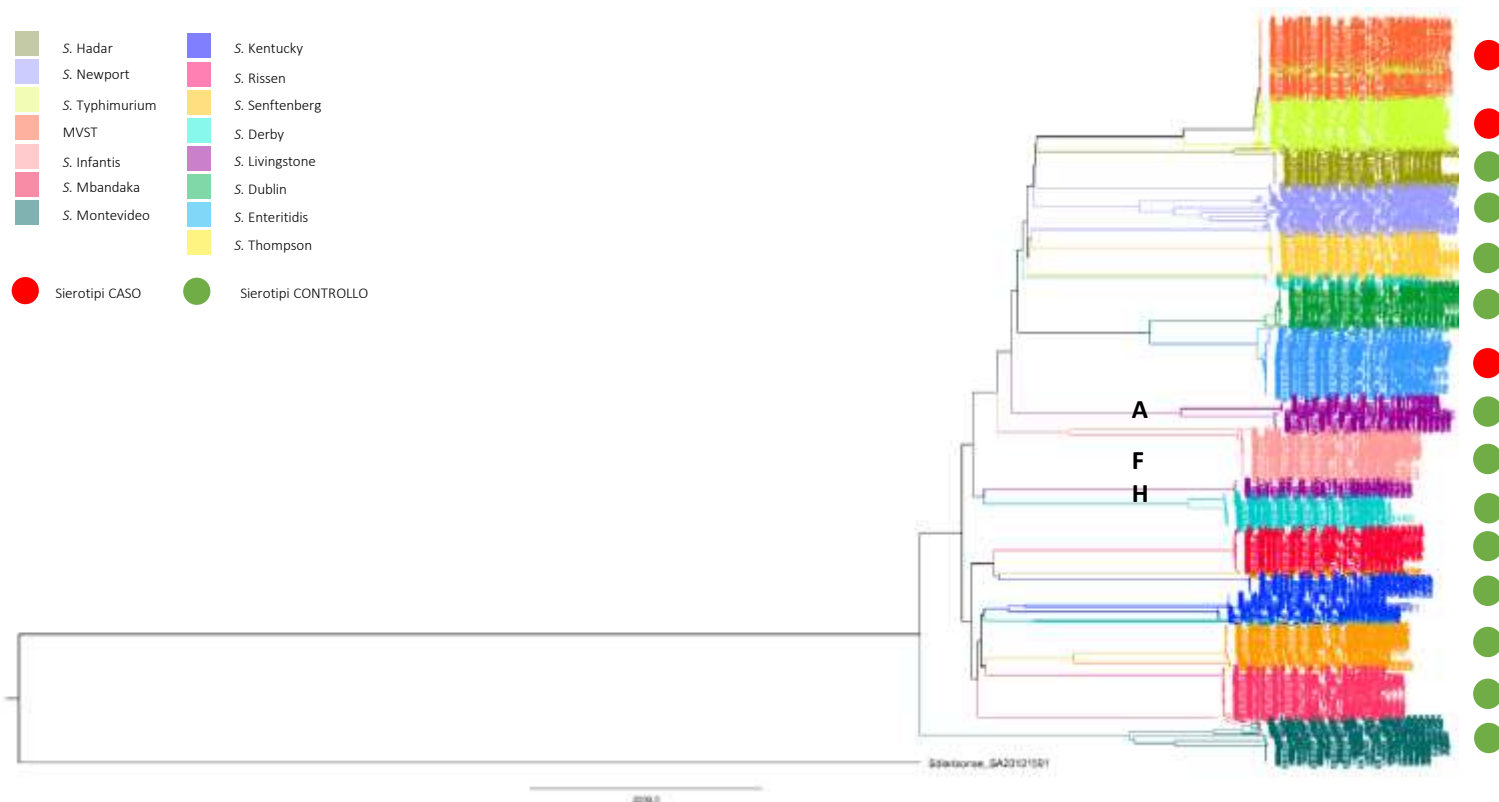
759 *Salmonella* genomes

- ceppi umani (H)
- ceppi animali (A)
- ceppi fonti alimentari (F)

Metodi:

Core genome SNPs (cgSNPs) phylogenetic analysis

Core genome SNPs phylogeny – studio popolazione oggetto di indagine



- Le sequenze clusterizzano in base a 1) **sierotipo** e 2) **sequence type (ST)**
- In generale i diversi ceppi non clusterizzano in relazione alla source indagata (A, F, H) con la sola eccezione dei genomi di **S. Livingstone**
- Alcuni sierotipi sono **polifiletici** (S. Derby, S. Newport, S. Kentucky)

Caratterizzazione fenotipica e genotipica di una selezione di isolati



Effect of pH and Salinity on the Ability of *Salmonella* Serotypes to Form Biofilm

Sara Petrin^{1,2}, Marzia Mancin², Carmen Losasso^{1*}, Silvia Deotto⁴, John Elmerdahl Olsen² and Lisa Barco³

Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance correlation and plasmid characterization in *Salmonella* spp. isolates from Italy reveal high heterogeneity among serovars

Sara Petrin^{1,2}, Massimiliano Orsini¹, Andrea Massaro², John E. Olsen², Lisa Barco⁴ and Carmen Losasso^{1*}

Assessing phenotypic virulence of *Salmonella enterica* across serovars and sources

Sara Petrin^{1,2}, Lucas Wijnands³, Elisa Benincà³, Lapo Mughini-Gras^{3,4}, Ellen H. M. Delfgou-van Asch³, Laura Villa⁵, Massimiliano Orsini¹, Carmen Losasso^{1*}, John E. Olsen² and Lisa Barco⁶

Produzione di biofilm: approccio QUALITATIVO

Materiali:

88 ceppi *Salmonella*

- 15 sierotipi
- 6 isolati/sierotipo (eccezione: *S. Dublin*, *S. Mbandaka*)

Metodi:

Saggio colorimetrico in piastra

cinque condizioni sperimentali diverse

	TSB	cinque condizioni sperimentali diverse				Numero totale di isolati
		TSB pH 7 4% NaCl	TSB pH 7 10% NaCl	TSB pH 4.5 4% NaCl	TSB pH 4.5 10% NaCl	
Non produttore	1	0	0	11	2	14
Scarso	--	--	--	--	--	---
Moderato						
Forte						

- **Indipendentemente dal sierotipo**, il maggior numero di isolati è stato classificato come produttore di biofilm 'scarso' o 'moderato'

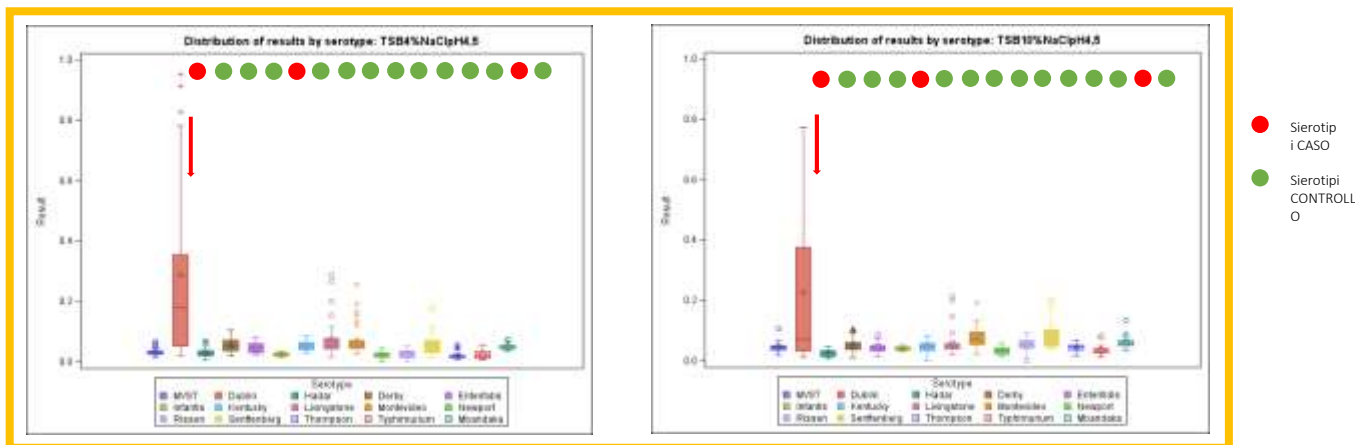
- L'aggiunta di **sale** stimola la produzione di biofilm

- Il **pH** ha influito **più del sale** sulla capacità dei ceppi di formare biofilm

Produzione di biofilm: approccio QUANTITATIVO

Materiali:
88 ceppi *Salmonella*

Metodi:
Saggio colorimetrico in piastra
Linear mixed model (LMM)



- I differenti sierotipi hanno manifestato diversa capacità di produrre biofilm, ma non è stato possibile definire un ranking
- Il LMM ha evidenziato differenze significative nel terreno TSB a pH 4.5 (S. Dublin ha prodotto la quantità maggiore di biofilm)
- I diversi sierotipi testati producono quantità diverse di biofilm e a seconda delle condizioni sperimentali -> **differenze intra-sierotipo** (elevata variabilità per S. Typhimurium, S. Derby, S. Infantis e S. Enteritidis)

● Produzione di biofilm - conclusioni

- **Esiguo numero di ceppi non produttori -> formazione di biofilm come processo attivato da *Salmonella* per reagire a stress ambientali**
- *S. Dublin* risulta essere il sierotipo con la **capacità di formare biofilm più elevata**, anche a pH 4.5. La sopravvivenza in ambienti acidi garantisce che anche un piccolo inoculo riesca a causare gravi infezioni nell'uomo, nonostante il sierotipo sia adattato ai bovini
- *S. Senftenberg* è produttore di biofilm (+++ TSB con NaCl 10%), nonostante sia raramente isolato da uomo. Interessante perché presenta elevata resistenza ad antimicrobici e persistenza negli impianti di lavorazione di alimenti
- **Sierotipi frequentemente isolati da casi di infezioni umane (sierotipi-CASO) non mostrano grandi capacità di produrre biofilm**
- **Non si osserva un trend sierotipo-specifico**, anzi emerge una **elevata variabilità intra- e inter-sierotipo** nella capacità di produrre biofilm

La **capacità di formare biofilm** è una **caratteristica ceppo-specifica**, piuttosto che sierotipo-specifica -> importante considerare a livello di ceppo la capacità di produrre biofilm come **contributo alla persistenza negli ambienti e sulle superficie, e come possibile fonte di infezioni per l'uomo**

Quantificazione *in vitro* della virulenza

Materiali:

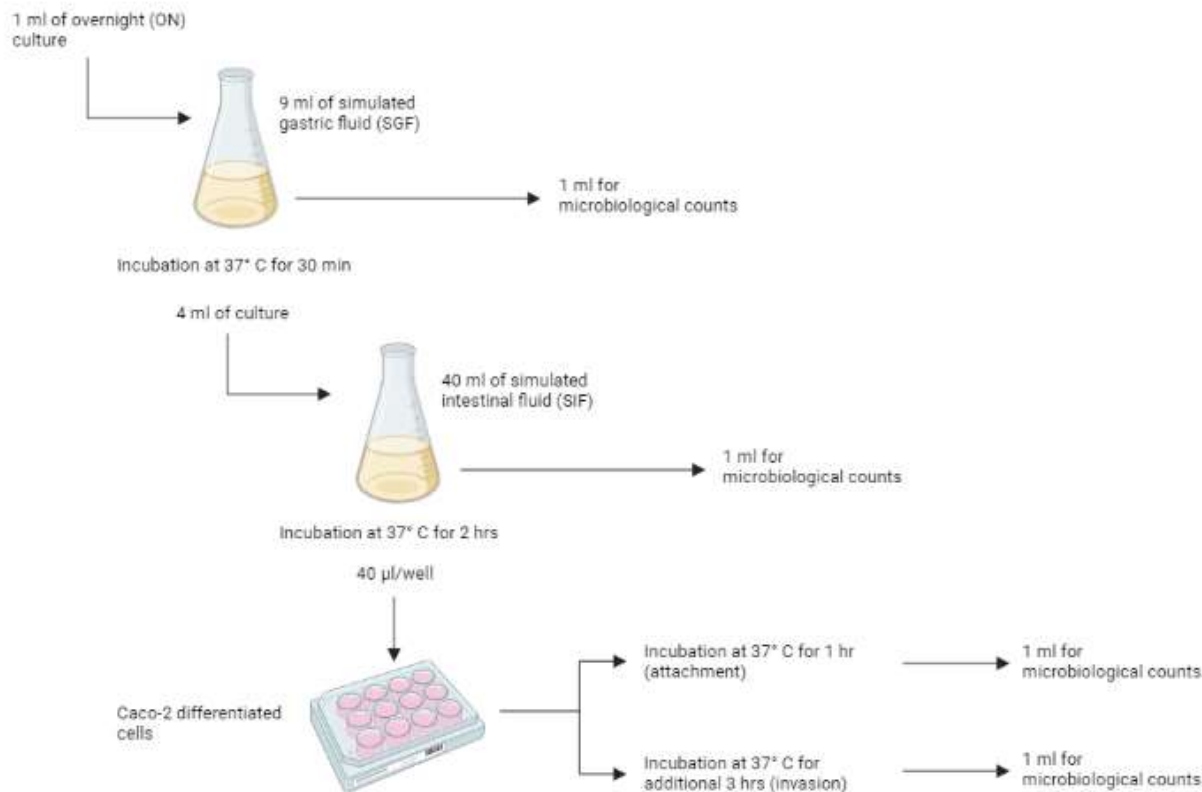
87 ceppi *Salmonella*

- 15 sierotipi
- 6 isolati/sierotipo (eccezione: *S. Dublin*, *S. Mbandaka*, *S. Montevideo*)

Metodi:

Sistema gastrointestinale (GIT) *in-vitro*

Modelli Bayesiani

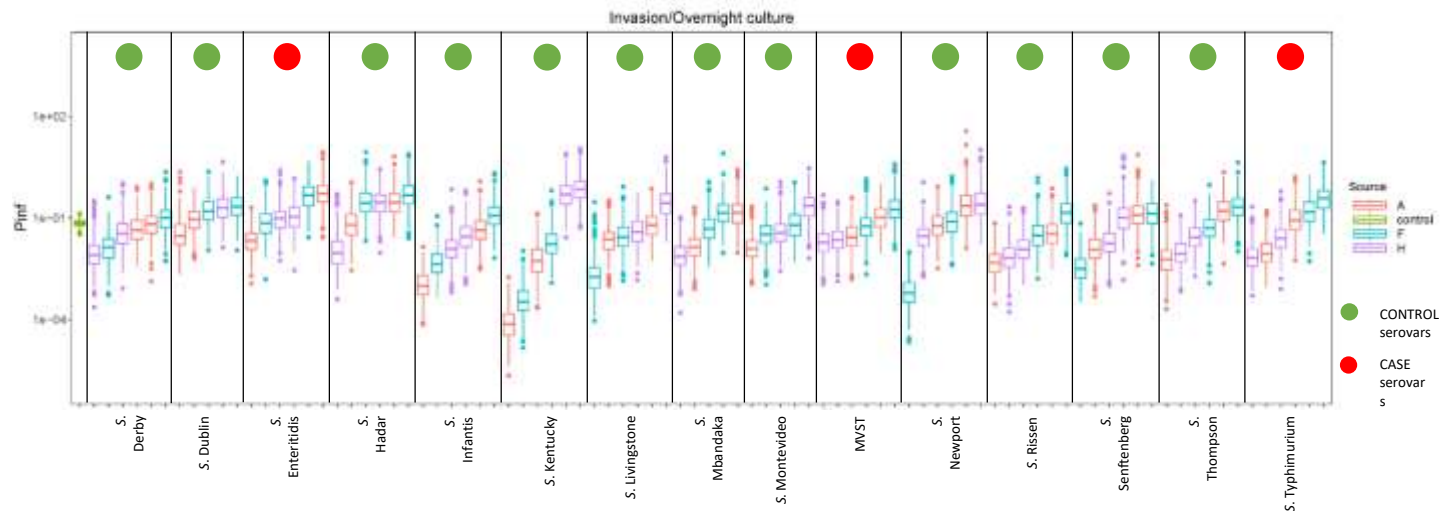


Sistema GIT (gastro-intestinal tract) *in-vitro* per **quantificare l'infettività** di un ceppo, stimandone la **probabilità di infezione**

$$P(\text{inf}) = \frac{[\text{Salm}] \text{ invasion}}{[\text{Salm}] \text{ ON}}$$

Wijnands et al., 2017; Kuijpers et al., 2019

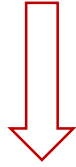
Quantificazione *in vitro* della virulenza



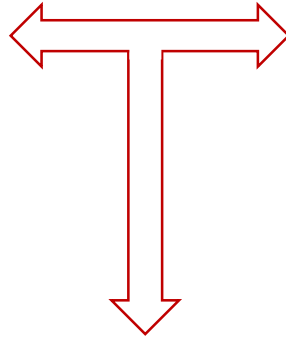
- Variabilità tra i sierotipi testati e tra i ceppi di un singolo sierotipo
- Ci sono delle differenze di $P(\text{inf})$ tra le diverse fonti, ma non vi è un andamento costante tra i diversi sierotipi
- **Sierotipi-CASO** hanno mostrato **elevata variabilità** nei valori di $P(\text{inf})$, e solitamente per questi sierotipi i valori di **$P(\text{inf})$ dei ceppi H < $P(\text{inf})$ dei ceppi A e F**

● Predizione dell'infettività *in-vitro* P(inf)

759 genomi annotati di
Salmonella



pangenoma



Matrice genica di
presenza/assenza

Sequenze proteiche scaricate
da:

- VirulenceFactor DB
- BacMet
- TADB

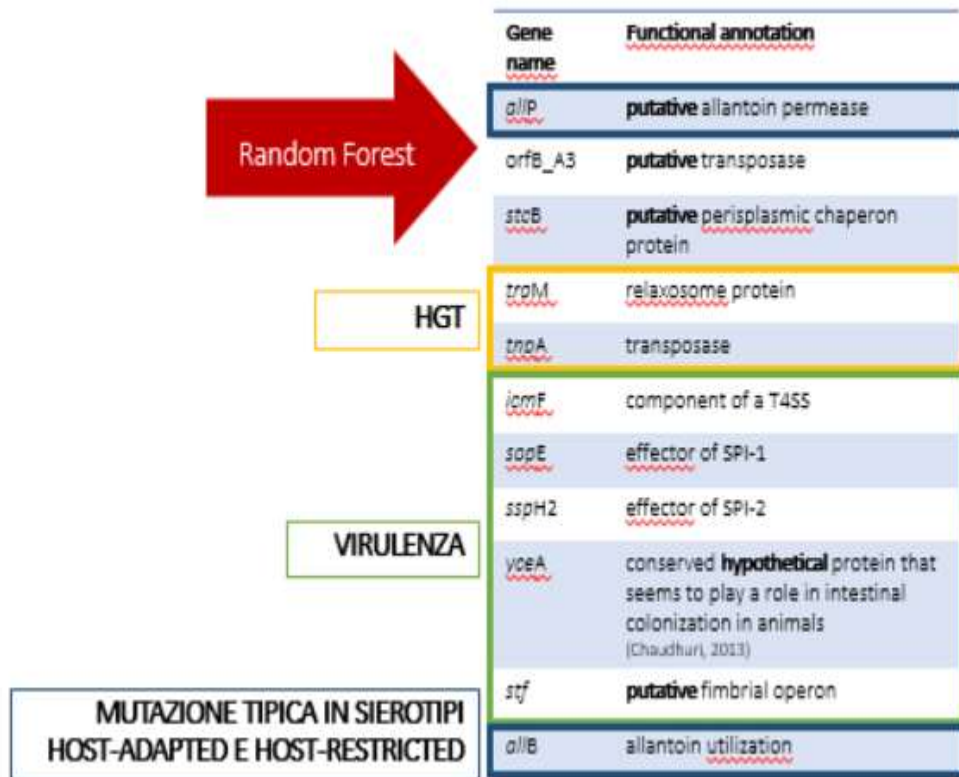
Systematic review della
letteratura per individuare geni
potenzialmente coinvolti nei
meccanismi di persistenza,
invasività, capacità di produrre
biofilm, tolleranza ai metalli
pesanti e ai biocidi

● Predizione dell'infettività *in-vitro* P(inf)

L'algoritmo Random Forest m non ha mostrato una buona *performance*:

- **ridotta numerosità campionaria** rispetto al numero di predittori;
- le differenze nei valori di P(inf) possono essere causate da differenze nei livelli di **espressione** dei geni
- **semplificazione** del sistema GIT rispetto al tratto gastrointestinale animale/umano

Matrice genica di presenza/assenza



● Virulenza – conclusioni

- Sono stati osservati un ampio *range* di valori di P(inf) e variabilità tra i sierotipi e tra i singoli ceppi appartenenti ad uno stesso sierotipo → elevata variabilità nei meccanismi di virulenza
- Per alcuni sierotipi, è stato osservato un **possibile link tra** i valori di **P(inf)** e il **ST** (S. Kentucky ST152 vs S. Kentucky ST198; S. Typhimurium ST19 vs S. Typhimurium ST34)
- **S. Dublin** e **S. Hadar** sono i sierotipi che più efficientemente sono riusciti ad attraversare il sistema GIT ed invadere le cellule epiteliali umane
- **Risultati non conclusivi** circa l'**identificazione di specifici geni** di virulenza per riuscire a predire la patogenicità (P(inf)) di uno specifico ceppo di *Salmonella*. Vi sono altri fattori coinvolti nella virulenza che non dipendono dal patogeno stesso, ma da altri elementi come per esempio dall'ambiente in cui l'infezione avviene

Resistenza agli antimicrobici

Materiali:

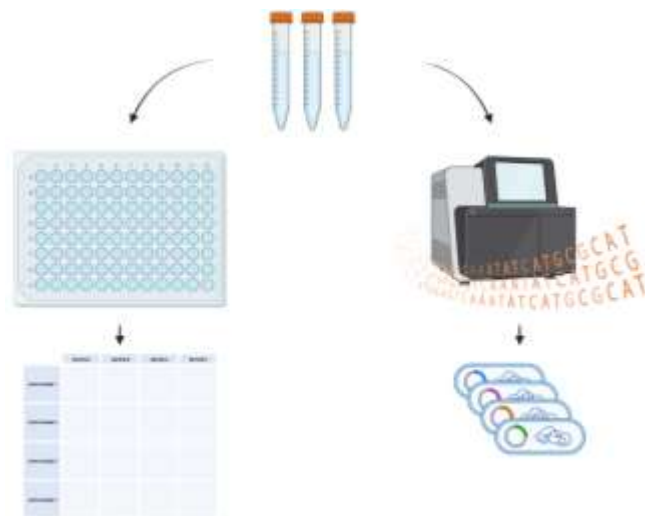
88 ceppi *Salmonella*

- 15 sierotipi
- 6 isolati/sierotipo (eccezione: *S. Dublin*,
S. Mbandaka)

Metodi:

**Determinazione MIC mediante metodo di
microdiluzione in brodo**

Ricerca di ARGs e repliconi plasmidici



Determinazione della MIC



- Tutti i ceppi di *S. Senftenberg* pansuscettibili
- ***S. Dublin*** e ***S. Enteritidis***: ceppi resistenti solo a **colistina** → resistenza intrinseca
- Diversi sierotipi con **resistenze multiple** (*S. Infantis*, *S. Derby*, *S. Kentucky*, *MVST* (5/6 ceppi R a AmpSulTet))

● Resistenza agli antimicrobici e plasmidi – conclusioni

- Elevati livelli di resistenza fenotipica ad **ampicillina**, **sulfonamidi** e **tetraciclina**
- La percentuale di isolati MDR è elevata, specialmente nei serovars MVST e S. Infantis
- È stata osservata concordanza tra la resistenza fenotipica e la predizione di ARGs per: **ampicillina**, **cloramfenicolo**, **tetraciclina** e **sulfametossazolo**: per queste molecole, è possibile ipotizzare l'uso del WGS come strumento di sorveglianza
- Soltanto un **numero limitato di ARGs** è stato localizzato su regioni in cui è stato individuato anche un replicone plasmidico – nella maggior parte dei casi ciò è avvenuto per **repliconi plasmidici IncQ1**, frequentemente individuati in isolati di MVST

● Conclusioni

- Il sierotipo è poco predittivo delle caratteristiche valutate
- Per SE le caratteristiche genotipiche e fenotipiche indagate non giustificano l'elevato successo epidemiologico che caratterizzano questo sierotipo
- Per S. Senftenberg, S. Dublin e S. Hadar invece abbiamo identificato maggiore capacità di produrre biofilm o invadere le cellule umane, ma per questi sierotipi i numeri di casi sono molto più contenuti rispetto ai sierotipi target
- **Altri fattori correlati in particolare all'interazione ospite-batterio, che non sono stati esaminati nello studio, probabilmente influiscono nel determinare la patogenicità di un ceppo di *Salmonella***



- **Sorveglianza routinaria - cosa ci dicono i risultati del PNCS**

Sebbene per quanto concerne i sierotipi target come definiti dalla normativa corrente la situazione rimanga pienamente conforme nelle diverse filiere vi sono 'isolati' che meritano di essere particolarmente attenzionati

- **Sorveglianza dei focolaio di malattia alimentare**

Il miglioramento degli strumenti diagnostici e dei relativi sistemi di sorveglianza nei differenti contesti rende molto più efficiente l'attuale sistema di identificazione degli outbreak nel panorama internazionale (con le ovvie conseguenze che ne derivano)

- **Attività di ricerca**

Sebbene ci siano delle differenze tra i diversi sierotipi in termini di potenziale patogenicità, notevoli differenze si riscontrano anche intra-sierotipo (ceppo dipendente) – al momento non vi sono marker chiari e univoci che ci permettono di identificare in modo inequivocabile le subpopolazioni d'interesse in termini di potenziale patogenicità

Ringraziamenti



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport



Dott.ssa Sara Petrin



Dott. Massimiliano Orsini