

REPORT DEL LABORATORIO DI RIFERIMENTO REGIONALE PER LE MALATTIE A TRASMISSIONE ALIMENTARE (LRMTA)

ANNO 2021

A cura di: Maria Laura De Marchis, Valeria Russini, Paola De Santis,
Sarah Lovari, Tatiana Bogdanova, Teresa Bossù, Stefano Bilei

Sommario

Il Laboratorio di riferimento Regionale per le Malattie a Trasmissione Alimentare (LRMTA).....	2
Casi di MTA notificati al LRMTA ed indagini analitiche svolte presso l’Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana “M. Aleandri” nel 2021	3
Indagine 1: caso di listeriosi legato al consumo di salsiccia stagionata sottovuoto verificatosi nel sud del Lazio a febbraio 2021	4
Indagine 3: ricomparsa di un’infezione di origine nosocomiale da <i>Listeria monocytogenes</i> presso un ospedale del sud del Lazio	6
Indagine 3: caso di epatite itterigena acuta da HEV legato al consumo di salsiccia stagionata sottovuoto nell’alto Lazio	8
Discussione dei risultati ottenuti	9
Ringraziamenti	13
Riferimenti bibliografici	13

Il Laboratorio di riferimento Regionale per le Malattie a Trasmissione Alimentare (LRMTA)

Il Laboratorio di riferimento Regionale per le Malattie a Trasmissione Alimentare (LRMTA) è stato formalmente riconosciuto con la Determinazione Regionale n. G06447 del 28 maggio 2021 presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri".

Il LRMTA afferisce alla Unità Operativa Complessa "Microbiologia degli Alimenti" dell'IZSLT e svolge le seguenti attività:

- Fornisce supporto alle ASL in fase di organizzazione dei prelievi dei campioni alimentari e ambientali in caso di indagini per le Malattie Trasmesse da Alimenti (MTA)
- Esercita una funzione di raccordo tra le varie articolazioni dei Servizi coinvolti durante la raccolta delle informazioni nel corso di indagini per MTA
- Si interfaccia con i Laboratori di Microbiologia degli Alimenti della Sede Centrale e delle Unità Operative Territoriali (UOT) dell'IZSLT per il recupero degli esiti relativi alle prove svolte sui campioni prelevati nell'ambito delle indagini per MTA
- Esegue, in collaborazione con il laboratorio di Biotecnologie applicate agli alimenti, prove di tipizzazione molecolare, sequenziamento dell'intero genoma in NGS ed analisi bioinformatiche a partire dai dati di sequenza genomica degli isolati di origine alimentare, ambientale e umana raccolti dal Centro di riferimento Regionale per gli Enterobatteri patogeni (CREP) e dal Laboratorio di riferimento Regionale per i Patogeni a Trasmissione Alimentare di origine Umana (LRPTAU), per la verifica di appartenenza a focolai epidemici e per l'identificazione delle fonti di contaminazione alimentare e ambientale
- Trasmette le rendicontazioni delle indagini svolte alle seguenti Istituzioni:
 - SERESMI (Servizio Regionale per l'Epidemiologia, Sorveglianza e controllo delle Malattie Infettive)
 - Regione Lazio (Area Promozione della Salute e Prevenzione-Direzione Regionale Salute e Integrazione Sociosanitaria)
 - Ministero della Salute (Direzione generale della prevenzione sanitaria/Ufficio 5 - Prevenzione delle malattie trasmissibili e profilassi internazionale e Direzione generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione/Ufficio 8 - Sistema di allerta, emergenze alimentari e pianificazione dei controlli)
 - Strutture sanitarie e ASL coinvolte
- Gestisce i rapporti con l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) per garantire i livelli nazionali ed internazionali della sorveglianza delle MTA
- Partecipa al Gruppo Regionale per la gestione delle MTA (Atto di organizzazione Regionale n. G12436 del 12 ottobre 2021)

Casi di MTA notificati al LRMTA ed indagini analitiche svolte presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri" nel 2021

Nel corso dell'anno 2021 sono stati collezionati dati relativi a 25 indagini per MTA. Le indagini sono state gestite dalle ASL RM1, 2, 3, 4, 6, di Latina, di Viterbo, di Rieti e dai N.A.S. di Roma. In 10 casi l'indagine è stata svolta su segnalazione alle Autorità Sanitarie Locali di singoli casi con diagnosi clinica di MTA e conferma diagnostica (5 casi di listeriosi, 3 casi di salmonellosi, 1 caso di botulismo, 1 caso di epatite acuta itterigena da HEV), a cui si aggiunge un caso di sospetto botulismo non confermato registrato presso il territorio dell'alto Lazio. In 11 casi le segnalazioni hanno riguardato un singolo paziente o gruppi di pazienti (4 casi singoli e 7 gruppi costituiti da 2 o più casi) che hanno riportato disturbi gastrointestinali, senza una specifica diagnosi clinica, per un totale di 54 casi. In un caso, i campionamenti sono stati effettuati su richiesta della Direzione Generale per l'Igiene e Sicurezza degli Alimenti e Nutrizione del Ministero della Salute in relazione ad un focolaio di *E. coli* STEC O157 segnalato dal Regno Unito a settembre 2021 e legato al consumo di angurie prodotte in Italia. Nei restanti due casi non è stato possibile, con un'indagine retrospettiva, reperire informazioni anagrafiche e cliniche rispetto alle persone coinvolte.

Complessivamente sono stati effettuati dai Servizi sanitari competenti 28 campionamenti di cui 9 presso abitazioni private, 6 presso punti pubblici di ristoro (4 ristoranti, 1 pizzeria ed 1 autonegozio), 5 presso punti di ristoro ad accesso limitato e servizi ad essi correlati (3 mense scolastiche, 1 centro di cottura, 1 cucina ospedaliera), 5 presso punti vendita al dettaglio (4 supermercati ed una macelleria), 2 presso aziende agricole, 1 presso uno stabilimento di produzione (caseificio).

Sono stati analizzati in totale 80 campioni di cui 56 (70%) alimentari e 24 (30%) ambientali. Dei 56 campioni alimentari, 23 (41,1%) corrispondevano al residuo di alimenti sospetti consumati dai pazienti (reperto prelevato presso l'abitazione privata o pasto test della mensa) e 30 (53,6%) sono stati reperiti presso ristoranti o punti di vendita al dettaglio indicati dai pazienti. Per 3 (5,4%) campioni alimentari non sono state fornite da parte delle Autorità competenti ulteriori informazioni a riguardo.

Dei 56 campioni alimentari analizzati, 29 (51,8%) appartenevano alla categoria degli alimenti "ready to eat" (RTE).

Complessivamente sono state riscontrate 4 positività tra i campioni ambientali (16,7% del totale), tutte per *Listeria monocytogenes*.

Per quanto riguarda la categoria dei campioni alimentari, 5 campioni (8,9% del totale), tutti a base di carne di suino, sono risultati positivi per la presenza di patogeni alimentari. In particolare, è stata riscontrata la presenza di *L. monocytogenes* in salsicce macinate di suino e in salsicce stagionate sottovuoto (entrambe analizzate durante l'Indagine 1) e in un campione reperto di gambuccio di prosciutto. Un campione di salsiccia stagionata sottovuoto è risultato positivo per la presenza del virus dell'Epatite E (HEV) (Indagine 3) ed un pasto test di arista agli aromi, prelevato presso una mensa scolastica, per la presenza di *Bacillus cereus* (Tabella 1).

Tabella 1. Numero di campioni analizzati nel corso delle 25 indagini per MTA eseguite nell'anno 2021, ripartiti per categoria d'appartenenza ed esiti analitici.

Categoria prodotto	Negativo	Positivo	Patogeno/tossina	Totale	RTE
Campione ambientale	20	4	<i>Listeria monocytogenes</i> (4)	24	0
Carne di suino	11	5	<i>Listeria monocytogenes</i> (3) HEV (1) <i>Bacillus cereus</i> (1)	16	5
Carne di pollame	2	0	-	2	0
Frutta e ortaggi	11	0	-	11	10
Latte e formaggi	10	0	-	10	9
Pesce e prodotti ittici	7	0	-	7	4
Uova	2	0	-	2	0
Misto	8	0	-	8	1
Totale	71	9	-	80	29

Gli unici casi in cui è stato possibile effettuare un confronto genetico tra isolato clinico e isolati di origine alimentare o ambientale sono riferibili a due indagini per casi singoli di listeriosi (Indagine 1 e 2) gestite dalla ASL di Latina e ad una per il caso di epatite acuta da HEV (Indagine 3) registrato dalla ASL di Rieti.

Di seguito si riportano i risultati nel dettaglio.

Indagine 1: caso di listeriosi legato al consumo di salsiccia stagionata sottovuoto verificatosi nel sud del Lazio a febbraio 2021

L'indagine è partita dalla segnalazione di un caso di listeriosi ricoverato nel mese di febbraio 2021 in giorni successivi presso due differenti strutture ospedaliere di Roma e provincia.

In data 11/03/2021 sono stati reperiti, dal Servizio Veterinario (ASL Latina) presso l'abitazione del paziente, campioni di salsicce stagionate sottovuoto, scamorza e prosciutto cotto in vaschetta ATM, successivamente conferiti alla DO di Microbiologia degli Alimenti dell'IZSLT. Le salsicce stagionate sottovuoto sono risultate positive per la presenza di ceppi di *Listeria monocytogenes* appartenenti ai due sierotipi 1/2b e 1/2c (Tabella 2).

In data 30/04/2021 la ASL Roma 6 ha effettuato un ulteriore prelievo di salsicce di suino macinate presso il punto vendita presso il quale il paziente aveva acquistato salsicce fresche per la successiva stagionatura domestica. Il campione, analizzato presso il medesimo laboratorio, è risultato positivo per la presenza di *L. monocytogenes* appartenente al sierotipo 1/2c.

Successivamente è stato eseguito il sequenziamento dell'intero genoma (Whole Genome Sequencing, WGS) degli isolati ottenuti. In Tabella 2 sono riepilogati i risultati delle analisi di tipizzazione sierologica e molecolare.

L'analisi del core genome Multilocus Sequence Typing (cgMLST), realizzata secondo lo "Schema Pasteur" che prende in considerazione le differenze alleliche calcolate su 1748 geni target, è stata eseguita sull'isolato clinico e su quelli di origine alimentare. I risultati hanno evidenziato l'esistenza di un unico cluster che includeva l'isolato 1/2b di origine umana e i 3 isolati 1/2b provenienti dal campione reperto di salsiccia stagionata, confermando la presenza di un link genetico fra questi ultimi. L'isolato 1/2c proveniente dal campione reperto di salsiccia stagionata (dall'abitazione privata) e l'isolato 1/2c proveniente dal campione di salsiccia macinata fresca (dal punto vendita) sono risultati geneticamente non correlati (Figura 1).

Pur essendo possibile concludere che l'insorgenza della listeriosi nel paziente sia associata al consumo delle salsicce stagionate resta sconosciuta l'origine della contaminazione. Nessuna correlazione è stata evidenziata con la carne acquistata presso il punto vendita indagato.

Tabella 2. Elenco dei ceppi di origine umana e alimentare isolati nel periodo di riferimento con i risultati delle prove di tipizzazione sierologica e molecolare.

	Descrizione	Luogo prelievo	Sierotipo	Sierogruppo WGS	MLST (ST)	MLST (CC)	Lineage
Isolato clinico	Paziente	Ospedale	1/2b	IIb	ST5	CC5	I
Salsiccia 1	Salsiccia stagionata sottovuoto	Abitazione privata del paziente	1/2b	IIb	ST5	CC5	I
Salsiccia 2	Salsiccia stagionata sottovuoto	Abitazione privata del paziente	1/2b	IIb	ST5	CC5	I
Salsiccia 2b	Salsiccia stagionata sottovuoto	Abitazione privata del paziente	1/2c	IIc	ST9	CC9	II
Salsiccia 3	Salsiccia stagionata sottovuoto	Abitazione privata del paziente	1/2b	IIb	ST3	CC3	I
Salsiccia 7	Salsiccia stagionata sottovuoto	Abitazione privata del paziente	1/2b	IIb	ST3	CC3	I
Salsiccia 8	Salsiccia stagionata sottovuoto	Abitazione privata del paziente	1/2b	IIb	ST5	CC5	I
Salsiccia punto vendita	Salsiccia fresca	Punto vendita	1/2c	IIc	ST9	CC9	I

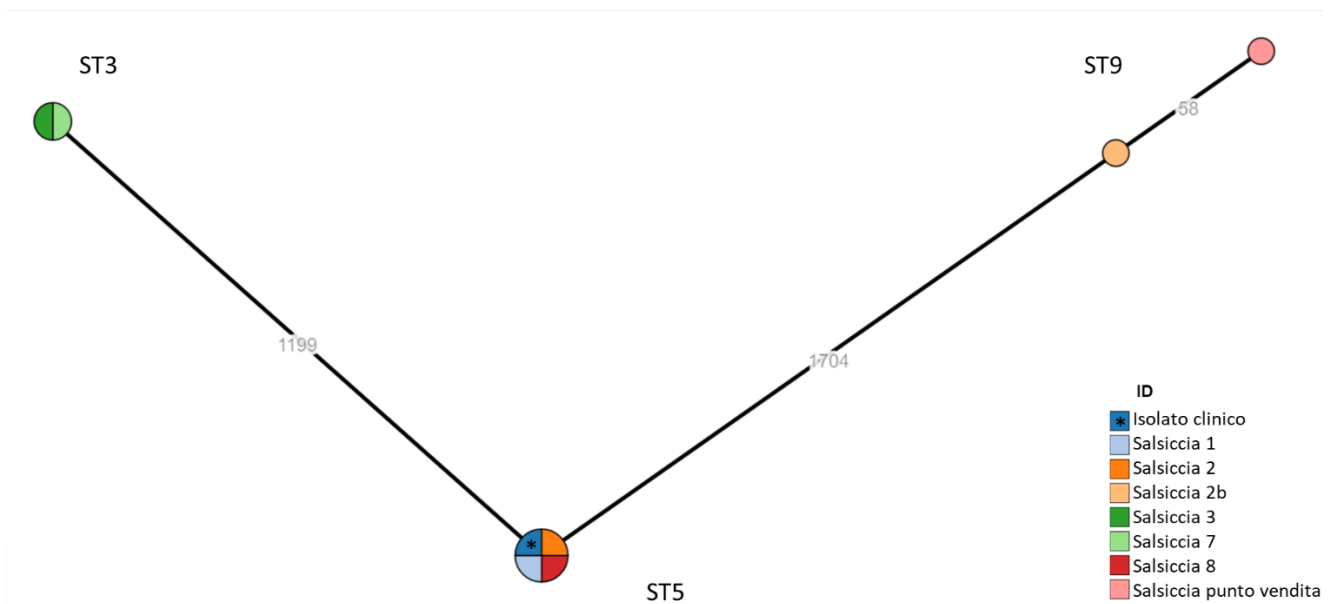


Figura 1. Rappresentazione grafica del Minimum Spanning Tree (MST) del cgMLST. L'appartenenza allo stesso cluster genico è confermata dal numero di distanze alleliche tra i diversi isolati analizzati, che risultano inferiori al cut-off di riferimento indicato dall'istituto Pasteur (pari a 7). L'isolato clinico è indicato con l'asterisco. I ceppi appartenenti allo stesso cluster dell'isolato clinico sono evidenziati in grassetto nella Tabella 2.

Indagine 2: ricomparsa di un'infezione di origine nosocomiale da *Listeria monocytogenes* presso un ospedale del sud del Lazio

I prelievi ambientali eseguiti presso un ospedale nel territorio del basso Lazio tra dicembre 2021 e gennaio 2022 si inquadrano nell'ambito di un'indagine più ampia gestita dalla ASL di Latina e iniziata a partire dal mese di settembre 2020. In quel periodo, tra il 21 agosto ed il 9 ottobre 2020, sono stati registrati 4 casi di listeriosi con esordio sintomatologico successivo al ricovero. Tramite campionamenti ambientali, effettuati presso la cucina ospedaliera e le successive analisi microbiologiche svolte presso la UOT Lazio SUD dell'IZSLT, è stato possibile identificare una contaminazione da *L. monocytogenes* su un'affettatrice, utilizzata temporaneamente sia per salumi che per arrostiti da servire ai pazienti. I 4 ceppi di origine umana, isolati dal laboratorio di Microbiologia dell'ospedale ed il ceppo di origine ambientale sono stati quindi sottoposti presso il CREP a caratterizzazione sierologica tramite sierotipizzazione, a tipizzazione molecolare tramite WGS e alla successiva analisi bioinformatica. Tutti e quattro gli isolati clinici sono risultati appartenere al sierotipo 1/2a e al Sequence Type (ST) 451. Lo stesso risultato è stato ottenuto per l'isolato dall'affettatrice della cucina ospedaliera. L'analisi del core genome (cgMLST), ha evidenziato l'appartenenza dei 4 isolati umani e dell'isolato ambientale allo stesso cluster confermando l'ipotesi di un'infezione nosocomiale. Dopo l'identificazione dell'affettatrice come

probabile fonte della contaminazione, è stata disposta una sospensione temporanea delle attività e l'adozione di un servizio esterno per la fornitura di pasti confezionati per eseguire un intervento di sanificazione straordinaria nella cucina dell'ospedale. La società di gestione della cucina ha successivamente ripristinato le condizioni igienico-sanitarie nel rispetto del Reg (UE) 2017/625. Successivamente un laboratorio privato accreditato ha effettuato campionamenti ambientali presso la cucina ospedaliera accertando l'assenza di *L. monocytogenes*. Dopo cinque giorni, il centro di cottura è stato riaperto.

In data 27/12/2021 è pervenuto presso la UOT Lazio SUD un ceppo di *L. monocytogenes* isolato da emocoltura di un paziente, ricoverato presso il medesimo ospedale. Il ceppo è stato trasferito il giorno successivo alla sede centrale di Roma presso il LRPTAU, per le analisi di tipizzazione sierologica e molecolare. La sierotipizzazione ha indicato l'appartenenza al sierotipo 1/2a. Ulteriori positività per la presenza di *L. monocytogenes* (Tabella 3) sono state poi riscontrate presso il laboratorio della UOT Lazio SUD in seguito all'ispezione e ai campionamenti ambientali effettuati dal SIAN della ASL di Latina in data 28/12/2021 e 03/01/2022 presso la cucina ospedaliera.

Successivamente, tutti i ceppi isolati aventi sierotipo 1/2a sottoposti a caratterizzazione molecolare profonda tramite WGS sono risultati appartenere al ST451 (Tabella 3), lo stesso identificato per gli isolati dei casi ricoverati presso il medesimo ospedale tra settembre ed ottobre del 2020.

La seguente Tabella riporta i risultati relativi a sierotipo, sierogruppo *in silico*, Sequence Type (ST), Clonal Complex (CC) e il Lineage di appartenenza degli isolati analizzati.

Tabella 3. Elenco isolati clinici e ambientali legati all'ospedale del basso Lazio, tipizzati presso l'IZSLT nel periodo dicembre 2021-gennaio 2022.

	Descrizione	Sierotipo	Sierogruppo WGS	MLST (ST)	MLST (CC)	Lineage
Isolato clinico 2021	Paziente 2021	1/2a	Ila	451	11	II
1-2021	Tavoli cucina	1/2a	Ila	451	11	II
	Cella frigo n. 5	1/2c	-	-	-	-
2-2021	Coltelli reparto	1/2a	Ila	451	11	II
2022	Affettatrice zona macelleria	1/2a	Ila	451	11	II
	Pozzetto scarico ingresso	4b/4e	-	-	-	-
	Piani di appoggio +tagliere +scaffalature +zona verdure	4b/4e	-	-	-	-

Successivamente, l'analisi del core genome (cgMLST) ha dimostrato l'appartenenza allo stesso cluster dell'isolato umano, degli isolati ambientali riferibili ai coltelli del reparto e all'affettatrice della zona macelleria. Inoltre, confrontando le sequenze di questi 3 isolati con quelle degli isolati 1/2a indagati alla fine del 2020, si è riconfermata l'appartenenza ad un unico cluster genico, attestando un'origine comune con il ceppo di *L. monocytogenes* che aveva causato nel 2020 l'infezione nosocomiale (Figura 2).

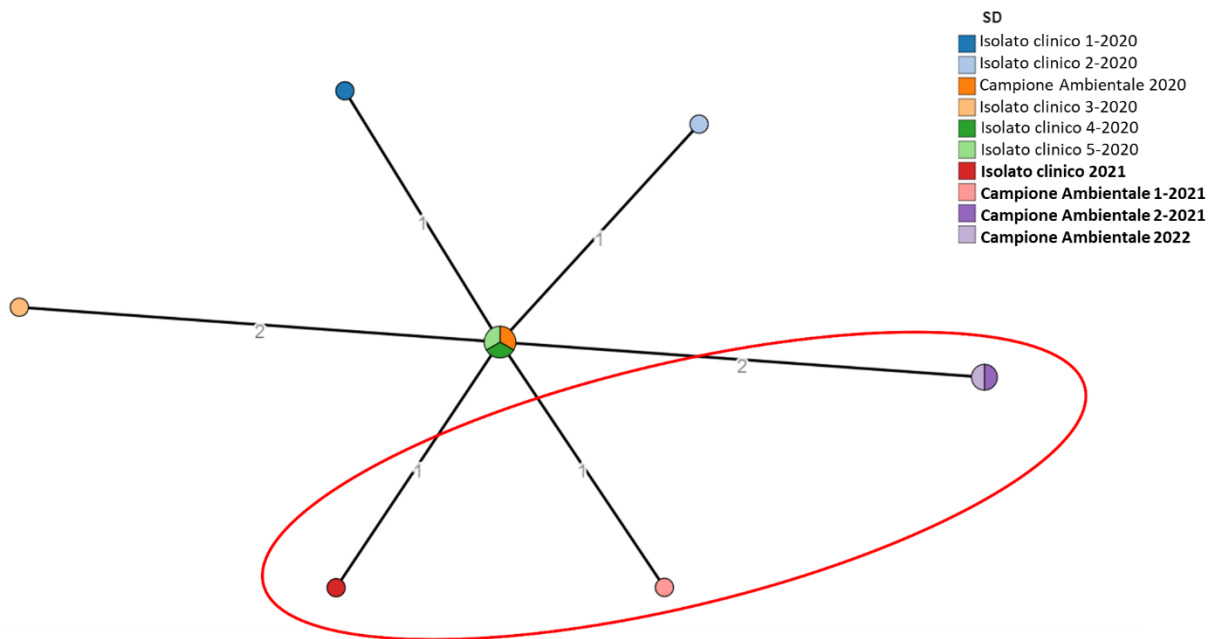


Figura 2. Rappresentazione grafica del MST del cgMLST. Sono riportati tutti gli isolati coinvolti nelle indagini riguardanti l'infezione nosocomiale. L'appartenenza allo stesso cluster genico è confermata dal numero di distanze alleliche tra i diversi isolati analizzati, che risultano inferiori al cut-off di riferimento indicato dall'istituto Pasteur (pari a 7). Il cerchio rosso indica gli isolati relativi alla più recente indagine, condotta tra la fine del 2021 e l'inizio del 2022, in grassetto nella legenda.

Indagine 3: caso di epatite itterigena acuta da HEV legato al consumo di salsiccia stagionata sottovuoto nell'alto Lazio

Il caso in questione riguarda un paziente ricoverato presso un ospedale del territorio dell'alto Lazio, successivamente trasferito in un ospedale nella città di Roma. Il paziente ha dichiarato di aver consumato salsicce di fegato essiccate acquistate il giorno precedente presso una macelleria locale e la data dell'esordio dei sintomi. Le feci del paziente inviate al laboratorio di Virologia dell'INMI Spallanzani sono risultate positive per HEV. Successivamente, è stato effettuato presso il medesimo laboratorio, il sequenziamento della regione parziale del gene *ORF2*. Uno dei campioni di salsiccia prelevati dalla ASL di competenza e analizzato presso il Laboratorio di Biotecnologie applicate agli alimenti dell'IZSLT, è risultato positivo per la presenza del virus dell'HEV. Il campione è stato quindi inviato al Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare presso l'ISS dove è stato effettuato il sequenziamento della stessa regione parziale del gene *ORF2*. I dati di sequenza

ottenuti dal campione di salsiccia sono risultati identici a quelli dell'isolato clinico indagato ed entrambi correlati ad un cluster di HEV evidenziato nello stesso territorio nel 2019.

Discussione dei risultati ottenuti

Il presente report descrive con approccio retrospettivo per l'anno 2021, l'esperienza del Laboratorio di riferimento Regionale per le Malattie a Trasmissione Alimentare (LRMTA), formalmente riconosciuto presso l'IZSLT dalla Regione Lazio a maggio 2021 ma già operante in quest'ambito da diversi anni, grazie alle attività condotte dal CREP e dalla Direzione Operativa Microbiologia degli Alimenti afferenti al medesimo ente.

Per meglio comprendere i punti di forza e i fattori di criticità legati alla gestione delle MTA, si riportano i dati relativi al numero di indagini trattate nel 2021 e nel triennio precedente nel Grafico 1.

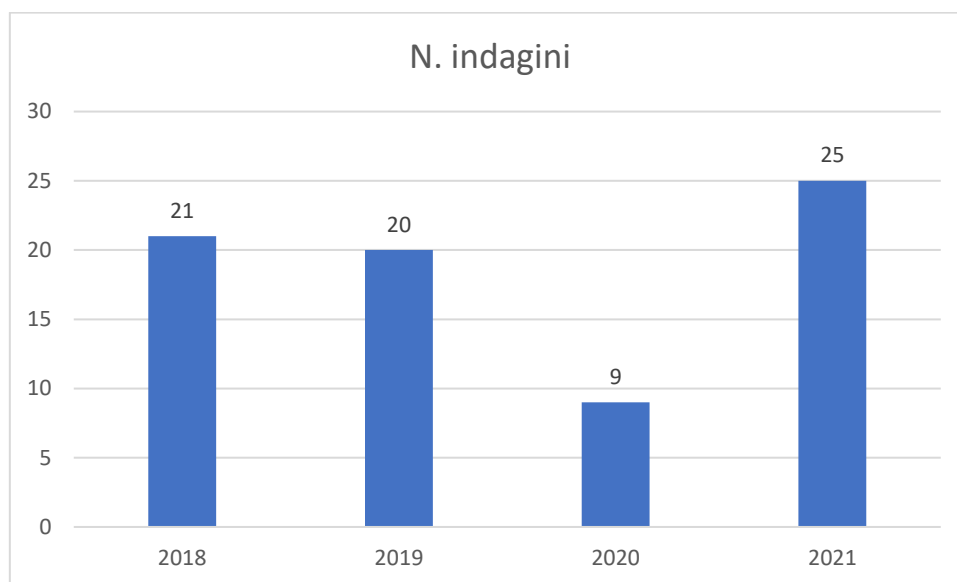


Grafico 1. Numero di indagini epidemiologiche trattate nella regione Lazio nel quadriennio 2018-2021. Il numero indicato fa riferimento ai casi per cui sono state eseguite prove microbiologiche su campioni alimentari o ambientali pervenuti presso l'IZSLT.

Il dato più rilevante è rappresentato dal decremento di casi registrato nell'anno 2020 (9 rispetto ai 21 del 2018 e ai 20 del 2019), calo probabilmente dovuto ad una serie di effetti diretti e indiretti della pandemia da SARS-CoV-2. L'anno 2020 ha visto, con l'attuazione del "lockdown", la chiusura di molti servizi di ristoro, con la conseguente riduzione del numero di indagini eseguite presso mense, ristoranti o servizi correlati, la concomitante riduzione di flussi turistici e la maggiore attenzione alle pratiche di disinfezione e sanificazione legate alla situazione pandemica da SARS-CoV-2. È possibile ipotizzare che nel 2020 nel Lazio, così come nel resto della nazione, i ricoveri per patologie non gravi siano diminuiti sia per un aumento delle pratiche di "self care" che per un decremento del numero di posti letto disponibili. Va inoltre considerata per quel periodo, una limitata disponibilità dei servizi e degli operatori generalmente coinvolti nella gestione delle indagini

epidemiologiche per MTA (servizi di prevenzione delle ASL, osservatori epidemiologici, etc.). Rispetto ai 2 anni precedenti la pandemia, invece, nel 2021 è stato registrato un leggero incremento nel numero delle segnalazioni (25 in totale), trend che sembra confermarsi anche nell'anno in corso con il primo semestre che conta già 16 indagini.

Nella Tabella 4 si riepiloga il numero di ceppi isolati nella regione Lazio nel 2021 e conferiti all'IZSLT.

Tabella 4. Numero di isolati di origine umana conferiti al CREP/LRPTAU nel 2021 da strutture ospedaliere e laboratori privati del Lazio.

Patogeno	Numero isolati 2021
<i>Salmonella</i> spp.	403
<i>Listeria monocytogenes</i>	34
<i>Campylobacter</i> spp.	155
<i>Yersinia enterocolitica</i>	10
<i>Escherichia coli</i> STEC	1
<i>Shigella</i>	1
<i>Vibrio cholerae</i>	1

Come riportato, risulta un'evidente discrepanza tra l'alto numero di isolamenti notificati tramite i sistemi di sorveglianza di laboratorio e i casi di sospetta MTA in cui è stato coinvolto l'IZSLT.

Le cause di tale differenza possono essere attribuite a diversi fattori concomitanti come il conferimento dei campioni oggetto di indagine ad altri Laboratori ufficiali. Alcuni dei campioni alimentari prelevati per casi di tossinfezione, infatti, vengono conferiti ad altri Laboratori o enti (es. ARPA), riducendo la possibilità per l'IZSLT di recuperare isolati batterici di origine alimentare da confrontare con quelli clinici, rendendo parziale e frammentaria la gestione delle indagini epidemiologiche. La non uniformità procedurale da parte dei servizi territoriali delle ASL, inoltre, potrebbe essere causata dal riconoscimento molto recente del Laboratorio di riferimento regionale per le MTA (LRMTA) presso l'IZSLT nella sede centrale di Roma. Si evidenzia, in aggiunta, che non tutti i singoli casi diagnosticati di MTA sono seguiti da indagini epidemiologica da parte delle Autorità competenti.

Una ulteriore criticità è rappresentata dal sistema di gestione delle notifiche (mancanza o ritardo delle segnalazioni, errata classificazione del tipo di patologia sul sistema di segnalazione delle malattie infettive PREMAL), dall'irreperibilità o indisponibilità dei pazienti (soprattutto nei casi meno gravi trattati dal medico di famiglia o presso il pronto soccorso) e dall'attivazione delle indagini soltanto per casi particolarmente gravi o per sospetti focolai di infezione.

Le prove microbiologiche effettuate sui campioni alimentari prelevati nel 2021, hanno fatto registrare una positività dei campioni ambientali pari al 16,7% e dei campioni alimentari dell'8,9%, per la presenza di patogeni a trasmissione alimentare. Il patogeno più comunemente rilevato è stato

L. monocytogenes. Considerando gli esiti delle analisi di sequenziamento e di “source attribution”, la percentuale di campioni positivi effettivamente riconducibili alla fonte di contaminazione che ha causato la tossinfezione si riduce ulteriormente. Infatti, solo in 3 indagini è stato evidenziato un effettivo link genetico tra isolati alimentari/ambientali ed isolati clinici (Indagini descritte 1,2 e 3).

In una delle indagini, data l'impossibilità di recuperare l'isolato clinico del caso di listeriosi ricoverato presso un ospedale di Roma, non è stato possibile trarre conclusioni rispetto ad eventuali correlazioni con il ceppo di *L. monocytogenes* isolato nel campione di gambuccio di prosciutto prelevato presso l'abitazione del paziente.

In un caso di tossinfezione riguardante circa 14 bambini, non è stato recuperato alcun isolato clinico, ma la probabilità che il consumo dell'arista agli aromi presso la mensa scolastica abbia causato l'episodio tossinfettivo risulta molto elevata.

Negli alimenti esaminati è stato infatti isolato un ceppo di *Bacillus cereus* portatore dei geni codificanti per la tossina emetica e la tossina diarroica, compatibile con la sintomatologia manifestata dai bambini coinvolti (vomito, astenia e crampi addominali con esordio a poche ore dal consumo dell'alimento indagato).

Il numero ridotto di successi nella risoluzione delle indagini di MTA è attribuibile a molteplici fattori. Da un punto di vista clinico, l'impossibilità di risalire alla fonte di contaminazione può essere talvolta dovuta ad un'anamnesi generica, tipica delle patologie gastroenteriche, e alla conseguente mancanza di informazioni che possano indirizzare correttamente la diagnosi e la selezione dei patogeni da indagare (mancata somministrazione o condivisione del questionario alimentare). Nel 2021 infatti, i dati a nostra disposizione evidenziano che in sole 10 indagini per sospetta MTA su 25 si è pervenuti ad una conferma diagnostica dei casi clinici (5 casi di listeriosi, 3 casi di salmonellosi, 1 caso di botulismo ed 1 caso di epatite da HEV).

La corretta identificazione dell'agente causale della tossinfezione è favorita quando il periodo di tempo trascorso tra la possibile esposizione e il campionamento da parte delle Autorità competenti è breve. Tale fattore dipende sia dalla tempestività degli interventi delle Autorità sanitarie che dal periodo di incubazione del patogeno, che in alcuni casi può essere molto lungo.

Altra criticità è data dall'indisponibilità dell'alimento sospetto contaminato perché completamente consumato o venduto, a cui consegue talvolta il campionamento di lotti diversi da quelli oggetto di indagine.

Ci sono inoltre da considerare i limiti intrinseci dei protocolli di campionamento e delle procedure analitiche. È noto infatti che i patogeni non sono uniformemente distribuiti negli alimenti e quindi la rilevazione è fortemente influenzata dal tipo di campionamento (numero di unità campionarie).

Non è infrequente che le quantità di materiale campionato, soprattutto quando si tratta di un alimento residuo del pasto oggetto di indagine, siano inadeguate e inferiori a quelle riportate dalle norme di riferimento per alcuni target microbiologici. In assenza di indicazioni cliniche e anamnestiche, i campioni alimentari e i residui del pasto vengono sottoposti a pannelli di prove più o meno ampi, come in circa la metà delle indagini riportate in questo report.

I risultati ottenuti nel corso dell'attività del laboratorio rimarcano l'importanza del supporto all'indagine epidemiologica del campionamento ambientale, pratica non sempre seguita dai Servizi

territoriali. Dai nostri dati infatti risulta che campionamenti ambientali sono stati effettuati soltanto nel corso di 3 indagini su 25.

Il sequenziamento diretto e in particolar modo la metodica NGS si sono rivelati strumenti fondamentali nello studio dei focolai, nelle indagini epidemiologiche e negli studi di “source attribution”. Questo tipo di approccio è inoltre fondamentale per la caratterizzazione genomica di ceppi patogeni, anche produttori di tossine, per identificarne le varianti genetiche e monitorare la diffusione dei determinanti di resistenza antimicrobica e di virulenza. Queste metodologie sono state applicate nelle indagini in cui erano disponibili sia gli isolati di origine alimentare e ambientale che quelli di origine umana (casi di listeriosi trattati presso l’IZSLT e caso di epatite E descritti in precedenza) e sono state risolutive per il corretto rintracciamento della probabile fonte di contaminazione.

In Italia, la metodologia di sequenziamento in NGS è applicata in maniera sistematica solo da alcune reti di sorveglianza delle malattie tossinfettive, quali ad esempio quella della listeriosi nell’uomo (Nota circolare 0008252 del Ministero della Salute-13/03/2017-DGPRES “Sorveglianza e prevenzione della Listeriosi”) che risulta supportata da una piattaforma di condivisione dei metadati e dati di sequenza (IRIDA-Aries) ed è gestita a livello nazionale dall’Istituto Superiore di Sanità.

Sul versante veterinario e alimentare, il Decreto legislativo n. 27 del 2 febbraio 2021, che fornisce le disposizioni per l’adeguamento al regolamento (UE) 2017/625, relativo ai controlli ufficiali sugli alimenti e sui mangimi e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sancisce che i laboratori ufficiali debbano trasmettere al relativo Laboratorio Nazionale di Riferimento o al Centro di Riferenza Nazionale, i ceppi dei microrganismi patogeni isolati nell’ambito del controllo ufficiale e delle altre attività ufficiali o le sequenze dell’intero genoma. Le stesse sequenze possono essere trasmesse anche al Centro di Riferenza Nazionale per le sequenze genomiche di microrganismi patogeni presso l’IZS Abruzzo e Molise.

Ciò rappresenta un punto di forza nel caso in cui un patogeno o una specifica patologia siano compresi in una rete di sorveglianza (es: Enternet Italia) o siano gestiti da un Laboratorio Nazionale di Riferimento o da un Centro di Riferenza Nazionale. Nei casi di estesi focolai o allerte internazionali sono proprio questi enti a gestire in maniera coordinata con i centri di riferimento regionali, qualora presenti, le attività di recupero e di confronto degli isolati di diversa origine. Queste organizzazioni, inoltre, contribuiscono alla conduzione di indagini epidemiologiche e alle attività di sorveglianza con la stesura di report periodici, che possono rappresentare un utile fonte informativa sulla circolazione dei diversi patogeni sul territorio. La situazione è più complicata per i patogeni a trasmissione alimentare per i quali non è ancora stato istituito uno specifico laboratorio di riferimento, come ad esempio il *Bacillus cereus* o il *Clostridium perfringens*, poco ricercati a livello clinico e non supportati dagli attuali sistemi di sorveglianza e dalle piattaforme che gestiscono i dati di tipizzazione.

Gli aspetti finora elencati sottolineano l’utilità di gestire contemporaneamente sia ceppi di origine animale, alimentare e ambientale che quelli di origine umana, secondo una prospettiva One-Health, come attuato presso l’IZSLT e l’ISS. Questo report evidenzia inoltre la centralità della collaborazione tra le diverse istituzioni coinvolte nella gestione delle MTA (IZS, ISS, SERESMI, autorità regionali e locali competenti). Nonostante ciò, si riscontra comunque la necessità di ulteriori interventi di

miglioramento finalizzati a standardizzare le procedure, intensificare le reti di scambio dati e a potenziare le indagini di MTA sul territorio regionale.

In particolare, si ravvisa la necessità di implementare i sistemi di comunicazione rapida tra le varie organizzazioni coinvolte nella gestione delle MTA e di consentire anche alle strutture laboratoristiche l'accesso al PREMAL per poter integrare o aggiornare i dati forniti dalle ASL. È necessario inoltre disporre che tutti i campioni prelevati nell'ambito di indagini per MTA siano conferiti al Laboratorio di riferimento per le Malattie a trasmissione Alimentare (LRMTA) e promuovere l'invio tempestivo da parte delle strutture ospedaliere e dei laboratori privati degli isolati di patogeni a trasmissione alimentare al CREP e al LRPTAU per le rispettive competenze.

Ringraziamenti

Ringraziamo per la gentile collaborazione il personale tecnico della UOC Microbiologia degli Alimenti, la UOC Diagnostica generale e le UOT della regione Lazio dell'IZSLT, le ASL, le strutture ospedaliere e i laboratori privati conferenti.

Riferimenti bibliografici

- Russini V, Corradini C, De Marchis ML, Bogdanova T, Lovari S, De Santis P, Migliore G, Bilei S, Bossù T. Foodborne Toxigenic Agents Investigated in Central Italy: An Overview of a Three-Year Experience (2018-2020). *Toxins (Basel)*. 2022 Jan 5;14(1):40. doi: 10.3390/toxins14010040.
- Russini V, Spaziante M, Zottola T, Fermani AG, Di Giampietro G, Blanco G, Fabietti P, Marrone R, Parisella R, Parrocchia S, Bossù T, Bilei S, De Marchis ML. A Nosocomial Outbreak of Invasive Listeriosis in An Italian Hospital: Epidemiological and Genomic Features. *Pathogens*. 2021 May 12;10(5):591. doi: 10.3390/pathogens10050591.