



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



© Foto di Spencer Davis

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

ANNI 2022-2023

A cura di: Andrea Francesco De Bene, Emilia Rasile, Maria Laura De Marchis, Valeria Russini, Paola De Santis, Sarah Lovari, Tatiana Bogdanova,
Teresa Bossù

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" negli anni 2022/23	3
Anno 2022.....	3
Anno 2023.....	9
Discussione dei risultati ottenuti	13
Ringraziamenti	17
Riferimenti bibliografici.....	17

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 i laboratori di "Biotecnologie applicate agli alimenti" e di "Diagnostica molecolare in sicurezza alimentare", 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 per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione-DGISAN)
 - 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" negli anni 2022/23

Nel corso degli anni 2022 e 2023 sono stati collezionati rispettivamente dati relativi a 28 e 37 indagini per MTA con un incremento del 12% e del 48% rispetto al 2021, anno di istituzione del LRMTA (Tabella 1 e 2).

Anno 2022

Nel corso dell'anno 2022 sono stati collezionati dati relativi a 28 indagini per MTA con un incremento del 12% rispetto al 2021, anno di istituzione del LRMTA (Tabella 1). In 11 dei 28 casi, l'indagine è stata svolta su segnalazione alle Autorità Sanitarie Locali di casi con diagnosi clinica di MTA e conferma diagnostica (5 indagini per casi di listeriosi, 4 indagini per casi di salmonellosi, 1 indagine per 3 casi di campilobatteriosi, 1 indagine per un caso di botulismo). Tra i casi con sospetti diagnostici definiti, ma non confermati, si segnalano 2 indagini per casi sospetti di salmonellosi, 2 indagini per casi sospetti di botulismo, 1 indagine per sospetta tossinfezione da *Staphylococcus aureus* e 1 indagine per sospetta intossicazione da funghi. Per 11 indagini il LRMTA non ha collezionato dati relativi ad uno specifico sospetto diagnostico; in uno di questi ultimi casi non sono state reperite informazioni cliniche rispetto alle persone coinvolte (ID 3).

Sono state condotte 3 indagini per listeriosi in relazione a 2 focolai extraregionali legati al consumo di porchetta prodotta nel Lazio (ID 23) e di wurstel di pollo prodotti in Veneto (ID 17 e ID 20). Nel caso ID 17 è stata effettuata la ricerca di *L. monocytogenes* su campioni di maionese, in una fase precoce dell'indagine coordinata dalla Direzione Generale per l'Igiene e Sicurezza degli Alimenti e Nutrizione del Ministero della Salute, in cui ancora non era stata identificata l'effettiva fonte della contaminazione. In altre due indagini, i campionamenti sono stati effettuati su prodotti a base di cioccolato in relazione ad un focolaio plurinazionale di *Salmonella* Typhimurium originatosi in Belgio (ID 8 e ID 13).

Complessivamente sono stati effettuati dalle Autorità Competenti (AC) 30 campionamenti, di cui: 10 presso abitazioni private, 6 presso punti pubblici di ristoro (1 bar, 1 pub, 1 tavola calda, 1 venditore di kebab, 1 fraschetta, 1 ristorante), 5 presso punti di ristoro ad accesso limitato e servizi ad essi correlati (2 ville per ricevimenti, 2 mense, 1 centro di cottura), 6 presso punti vendita al dettaglio (4 supermercati e 2 alimentari), 2 alla produzione (1 stabilimento di produzione di porchetta e 1 laboratorio artigianale di produzione di pasta fresca) e 1 presso un deposito.

Sono stati analizzati in totale 138 campioni, di cui 94 alimentari (68,1%), 39 ambientali (28,3%), 4 oggetti (2,9%), 1 animale (0,7%). Il campione animale era costituito da una larva di parassita isolata dal pasto sospetto (filetto di salmone) consumato da una paziente e conferito alla ASL dai genitori della medesima (ID 15). Nei casi ID 8 e 13, indagini relative agli ovetti di cioccolato, sono state analizzate separatamente anche le sorprese ed i loro contenitori (oggetti). Dei 94 campioni alimentari, 3 sono stati inviati al Laboratorio di Microbiologia dell'ARPA Lazio che ha effettuato l'isolamento di *Salmonella* spp. Gli isolati di *Salmonella* provenienti da tali matrici sono stati

successivamente inoltrati al Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni dell'IZSLT (ID 18).

Tra i 94 campioni alimentari, 55 (58,5%) corrispondevano al residuo di alimenti sospetti consumati dai pazienti (reperto prelevato presso l'abitazione privata o pasto test della mensa) e 85 (90,4%) appartenevano alla categoria degli alimenti "ready to eat" (RTE).

Complessivamente sono state riscontrate 4 positività (10,5%) tra i campioni ambientali (39), tutte per *L. monocytogenes*, in riferimento all'indagine ID 23 (cfr. Allegato 1).

Per quanto riguarda la categoria dei campioni alimentari (90), 7 campioni (7,8% del totale) sono risultati positivi per la presenza di patogeni alimentari. In particolare, è stata riscontrata la presenza di *L. monocytogenes* in 1 campione di polpette surgelate di carne di manzo e proteine di soia (ID 2). Un (1) campione di carne di kebab di pollo e tacchino in vaschetta sigillata è risultato positivo sia per la presenza di stafilococchi coagulasi positivi (*S. aureus* e altre specie) che per quella di enterotossine stafilococciche (ID 6). La presenza degli stafilococchi coagulasi positivi (*S. aureus* e altre specie) è stata riscontrata anche in 3 campioni di pesce (salmone, tonno e ombrina) analizzati nel contesto della medesima indagine (ID 14). Infine in avanzi di 2 differenti alimenti (trofie al pesto e pomodori a pezzi) è stata riscontrata la presenza di *Bacillus cereus* in basse concentrazioni (<4 ufc/g) (ID 24).

Tabella 1. Numero di campioni analizzati nel corso delle 28 indagini per MTA eseguite nell'anno 2022, ripartiti per categoria d'appartenenza ed esiti analitici.

Categoria prodotto	Negativo	Positivo	Patogeno/tossina	Totale	RTE
Campione ambientale	35	4	<i>L. monocytogenes</i> (4)	39	0
Carne, preparazioni a base di carne	7	0	-	7	6
Frutta, cereali e vegetali	17	1	<i>B. cereus</i> (1)	18	18
Latte e derivati	21	0	-	21	21
Pesce e prodotti ittici	7	3	Stafilococchi coagulasi positivi (<i>S. aureus</i> e altre specie) (3);	10	10
Uova	1	0	-	1	0
Misto	34	3	<i>L. monocytogenes</i> (1); Stafilococchi coagulasi positivi (<i>S. aureus</i> e altre specie)(1); enterotossine stafilococciche(1); <i>B. cereus</i> (1)	37	30
Altro	5	0	-	5	0
Totale	127	11	-	138	85

Indagine ID 18: focolaio di salmonellosi legato al consumo di un pasto in un punto di ristoro della provincia di Roma, settembre 2022

Questa indagine epidemiologica è stata avviata dalle AC in seguito alla diagnosi di salmonellosi in due fratelli presso il Pronto Soccorso dell'Ospedale G.B. Grassi di Ostia in data 06/09/2022. I due pazienti si erano presentati in P.S. il giorno precedente, lamentando entrambi una sintomatologia gastroenterica (vomito e diarrea) accompagnata da ipertermia ($T=39^{\circ}\text{C}$). Attraverso l'esame colturale coprologico è stata rilevata la presenza di *Salmonella* spp. in entrambi i pazienti. Gli isolati di *Salmonella* spp. sono stati quindi inviati al CREP dell'IZSLT in data 12/09/2022 e sono risultati entrambi appartenenti al sierotipo *S. Infantis* (formula antigenica 6,7: r :1,5 O:7 (C1)). In corso di indagine i due fratelli hanno riferito di aver cenato la sera precedente l'esordio dei sintomi presso un ristorante della provincia di Roma, insieme ad altre sei persone, e di aver consumato pasta alla carbonara. In data 06/09/2022 il SIAN (Servizio Igiene degli Alimenti e Nutrizione) della ASL Roma 3 ha effettuato presso il suddetto ristorante due campionamenti di alimenti sfusi: un pecorino sardo e un filetto di carne cruda.

I campioni alimentari sono stati consegnati al Dipartimento di Prevenzione e Laboratorio Integrato dell'ARPA Lazio, che ha rilevato in entrambi la presenza di *Salmonella* spp. Anche questi due isolati di *Salmonella* spp., pervenuti presso il CREP in data 13/10/2022, sono risultati appartenenti al sierotipo *S. Infantis* (formula antigenica 6,7: r :1,5 O:7 (C1)).

I due isolati alimentari e uno dei due isolati umani sono stati sequenziati con metodica WGS (Whole Genome Sequencing) in NGS (Next Generation Sequencing). Tutti i campioni sono stati confermati come *S. Infantis* e sono risultati appartenenti al Sequence Type ST32. L'analisi di clustering, calcolata utilizzando il cgMLST (core genome Multilocus Sequence Typing - schema Enterobase per *Salmonella enterica*- 3002 geni), ha evidenziato la stretta affinità genetica degli isolati, con 1-2 distanze alleliche tra l'isolato clinico e gli alimenti indagati, confermando l'appartenenza allo stesso cluster.

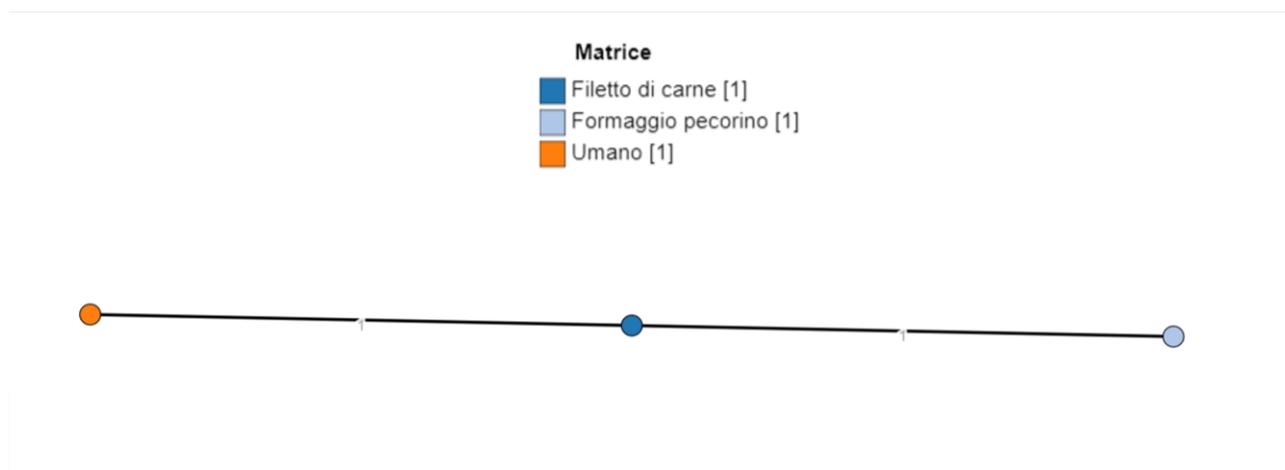


Figura 1. Rappresentazione grafica del Minimum Spanning Tree (MST) del cgMLST.

Indagine ID 23: focolai di listeriosi extra-regionali collegati al consumo di Porchetta di Ariccia IGP, settembre-novembre 2022

Quest'indagine è stata avviata in seguito alla notifica di due casi di listeriosi verificatisi in Nord Italia: uno in Piemonte, che ha condotto al decesso del paziente, l'altro in Lombardia (cluster 317 IRIDA Aries).

I suddetti casi sono stati collegati al consumo di Porchetta di Ariccia IGP commercializzata nel solo territorio nazionale della Regione Lombardia da una catena di supermercati. L'azienda responsabile della fornitura del prodotto è un prosciuttificio emiliano, che riceve il semilavorato di porchetta (tronchetto intero confezionato) da un'azienda laziale e si occupa del successivo sezionamento e confezionamento del prodotto in vaschetta.

Entrambe le aziende del Nord Italia hanno riscontrato la presenza di *L. monocytogenes* sul prodotto in questione dopo analisi effettuate in autocontrollo tra settembre ed ottobre 2022. È stata così avviata un'indagine epidemiologica congiunta da parte delle AC nelle regioni di appartenenza delle aziende coinvolte: Lombardia, Emilia-Romagna e Lazio. Sono conseguiti il ritiro ed il richiamo del prodotto per un totale di 8 lotti, risultati positivi a *L. monocytogenes*, ed è stata emanata un'allerta attraverso il RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed).

Analizzando la filiera del prodotto contaminato, è stato semplice constatare che la fonte di contaminazione fosse ascrivibile all'azienda produttrice del semilavorato. La ASL Roma 6 ha di conseguenza pianificato una serie di campionamenti sia sull'alimento prodotto dall'azienda, che sulle superfici ambientali all'interno dei locali di produzione. Tra i mesi di ottobre e dicembre 2022 l'AC ha effettuato 4 sedute di campionamento che hanno condotto alla raccolta di un totale di 34 campioni (32 tamponi di superficie e 2 alimenti). Le analisi di tutti i campioni, condotte dall'IZSLT, hanno evidenziato la presenza di *L. monocytogenes* in un totale di 4 campioni ambientali (11,8% sul totale: tombino zona di confezionamento, carrello spezie e tavoli nella stanza di lavorazione e palo porchetta) mentre le due matrici alimentari sono risultate negative.

Tutti gli isolati di *L. monocytogenes* dai campioni positivi riconducibili all'indagine interregionale, inclusi gli isolati umani e alimentari provenienti dalle regioni Lombardia ed Emilia-Romagna, sono stati inviati per le analisi di sequenziamento al Laboratorio Nazionale di Riferimento per Listeria dell'IZS di Teramo.

Dal primo campionamento nell'azienda è emerso che l'isolato di *L. monocytogenes* proveniente dal tombino della stanza di confezionamento apparteneva al ST1 (sierotipo 4b/4e). Le successive analisi di correlazione effettuate dall'IZS di Teramo con gli isolati alimentari (porchetta prelevata alla vendita confezionata presso il prosciuttificio) e clinici (caso ST1 piemontese) suggeriscono l'appartenenza allo stesso cluster genico (6-7 distanze alleliche e 6-7 SNPs di differenza). Dalle analisi di sequenziamento eseguite sugli isolati ottenuti dopo il secondo sopralluogo, è emerso che quelli provenienti dal carrello delle spezie e dal palo di cottura della porchetta appartenevano al ST1 (sierotipo 4b/4e), mentre quelli isolati dal tavolo della stanza di lavorazione appartenevano al ST77 (sierotipo 4b/4e ma non correlato alla presente indagine). Gli isolati provenienti dal carrello delle spezie e dal palo di cottura risultano strettamente correlati (1 distanza allelica), suggerendo una cross-contaminazione tra l'ambiente di lavorazione pre-cottura e quello post-cottura. I medesimi

isolati distano 6 distanze alleliche dal tombino e 8-9 distanze alleliche (10 SNPs) dall'isolato clinico e quelli alimentari.

I dati ottenuti indicano la possibile origine comune degli isolati ambientali, quelli clinici e quelli alimentari, rivelando tuttavia una correlazione genica al limite o superiore ai valori di riferimento generalmente utilizzati per le analisi di clusterizzazione (cut-off < 7). Tali risultati risultano inattesi rispetto a quanto riscontrato in analoghe indagini e con tempistiche di campionamento così vicine (circa 1 mese). Si sospetta, quindi, che la fonte di contaminazione possa provenire dall'esterno dello stabilimento in maniera continuativa (es: in fase di fornitura della materia prima).

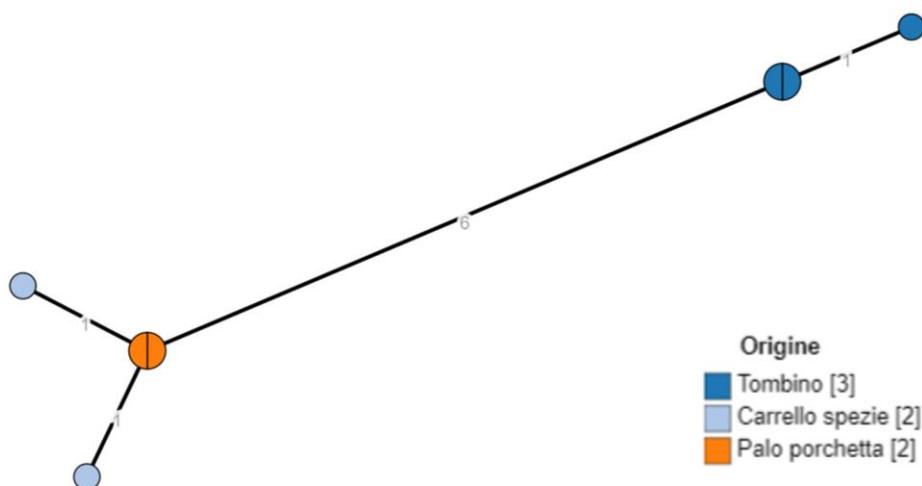


Figura 2. Rappresentazione grafica del Minimum Spanning Tree (MST) del cgMLST. L'appartenenza allo stesso cluster genico è confermata dal numero di distanze alleliche tra i diversi isolati analizzati, che risultano inferiori al cut-off di riferimento indicato dall'istituto Pasteur (pari a 7).

Casi legati a focolai extraregionali senza identificazione della fonte di contaminazione nel 2022

Altri casi da segnalare, ma che non hanno avuto un raffronto di positività su campioni prelevati nei contesti territoriali dell'IZSLT:

- due casi di salmonellosi (ID 13 e ID 8) rispettivamente a febbraio ed aprile del 2022 in due bambini del Lazio (RM), da imputare verosimilmente a consumo di dolci. L'infezione da *Salmonella* Typhimurium monofasica 4,5,12: i :- O:4 (B) nei due bambini è stata ricollegata ad un focolaio europeo di *S. Typhimurium* monofasica plurinazionale che ha coinvolto almeno 8 Paesi UE e il Regno Unito a partire da gennaio 2022, per un totale di 142 casi confermati, prevalentemente bambini al di sotto dei 10 anni di età. Gli outbreak sono stati collegati al consumo di vari alimenti a base di cioccolato prodotti in Belgio. Sui prodotti incriminati è stata diramata un'allerta a livello europeo e i lotti positivi sono stati ritirati e richiamati;

- due indagini epidemiologiche per listeriosi (ID 17 e ID20) sono state avviate dopo la segnalazione di 6 casi, con altrettanti ricoveri, in diversi ospedali romani tra giugno e settembre 2022 (ID 17) e di un altro caso con ospedalizzazione, sempre a Roma, nel settembre 2022 (ID 20). Anche in questo caso i campionamenti condotti dalle ASL sia su matrici alimentari (entrambe le indagini) che su superfici ambientali domestiche (ID 20) non hanno condotto ad alcun riscontro di positività per *L. monocytogenes*. In base agli esiti delle analisi di sequenziamento, gli isolati di tutti e 7 i casi clinici sono risultati appartenenti al sierotipo 1/2a (ST155) e sono stati correlati al focolaio nazionale di *L. monocytogenes* ST155 (appartenenza al cluster 192 di IRIDA Aries). Questo importante outbreak di listeriosi, i cui casi sono emersi a partire dal luglio 2021 e si sono estinti solo nel dicembre 2022, è stato il terzo più grande mai registrato in Europa secondo l'EFSA (European Food Safety Authority), ed ha condotto alla conferma di 109 casi, 6 decessi e 1 nato prematuro morto. Le indagini epidemiologiche, svolte a livello nazionale dalle AC, congiuntamente al Ministero della Salute, all'ISS e al LNR di Listeria dell'IZS di Teramo, hanno condotto all'identificazione dei wurstel prodotti da un'azienda veneta quali fonte di infezione di *L. monocytogenes* ST155. Dietro disposizione delle ACL e del Ministero della Salute, l'azienda ha dovuto implementare il processo produttivo dell'alimento incriminato aggiungendo un passaggio di pastorizzazione post-confezionamento, in modo da abbattere il rischio di contaminazione. Contestualmente tutti i lotti di wurstel, prodotti prima dell'applicazione di questo CCP (Critical Control Point) aggiuntivo, sono stati richiamati e ritirati dal mercato.

Anno 2023

Nel corso dell'anno 2023 sono stati collezionati dati relativi a 37 indagini per MTA con un incremento del 32,1% rispetto al 2022 e del 48% rispetto al 2021, anno di istituzione del LRMTA (Tabella 2). In 19 dei 37 casi, l'indagine è stata svolta su segnalazione alle ASL di casi con diagnosi clinica di MTA e conferma diagnostica (10 indagini per casi di listeriosi, 6 indagini per casi di salmonellosi, 2 indagini per casi singoli di botulismo, 1 indagine per un caso di shigellosi/infezione da *E. coli* enteroinvasivo enteropatogeno). Tra i casi con sospetti diagnostici definiti ma non confermati si segnalano 1 indagine per sospetta infezione da *E. coli* STEC, 1 indagine per sospetta infezione da virus dell'epatite A e 1 indagine per un caso sospetto di botulismo. Per 15 indagini il LRMTA non ha collezionato dati relativi ad uno specifico sospetto diagnostico; in 4 di questi ultimi casi non sono state reperite informazioni cliniche rispetto alle persone coinvolte.

Complessivamente sono stati effettuati dalle ACL 45 campionamenti, di cui: 12 presso abitazioni private, 10 presso punti pubblici di ristoro (7 ristoranti, 1 bar tavola calda, 1 pokè-bar, 1 punto di ristoro presso parco a tema), 12 presso punti di ristoro ad accesso limitato e servizi ad essi correlati (8 mense di cui 4 scolastiche, 2 ospedaliere e 2 private, 1 villa per ricevimenti, 1 hotel, 1 centro sociale e 1 servizio catering), 10 presso punti vendita al dettaglio (8 supermercati, 1 alimentari e 1 farmacia) e 1 presso stanza di ricovero ospedaliera.

Sono stati analizzati in totale 173 campioni di cui 112 alimentari (64,7%) e 61 ambientali (35,3%). Dei campioni alimentari, 6 sono stati inviati al Laboratorio di Microbiologia dell'ARPA Lazio che ha effettuato l'isolamento di *Salmonella* spp.. Gli isolati di *Salmonella* provenienti da tali matrici sono stati successivamente inoltrati al CREP dell'IZSLT per la sierotipizzazione (ID 18).

Dei 112 campioni alimentari, 45 (40,2%) corrispondevano al residuo di alimenti sospetti consumati dai pazienti (reperto prelevato presso l'abitazione privata o pasto test della mensa) e 86 (76,8%) appartenevano alla categoria degli alimenti "ready to eat" (RTE).

Complessivamente è stata riscontrata una sola positività (1,6%) tra i campioni ambientali (61), ovvero un'affettatrice di un supermercato positiva *L. monocytogenes*, in riferimento all'indagine ID 19.

Per quanto riguarda la categoria dei campioni alimentari (112), 2 campioni (1,8% del totale) sono risultati positivi per la presenza di patogeni alimentari. In particolare, è stata riscontrata la presenza di *S. Typhimurium* 4,12:i:1,2 O:4 (B) in 1 campione di "bistecca di mare" cotta al forno (ID 19) e la presenza di *Enterobacteriaceae* alla conta microbiologica ($4,6 \times 10^4$) in 1 campione di hamburger di bovino adulto (ID 6).

Tabella 2. Numero di campioni analizzati nel corso delle 37 indagini per MTA eseguite nell'anno 2023, ripartiti per categoria d'appartenenza ed esiti analitici.

Categoria prodotto	Negativo	Positivo	Patogeno/tossina	Totale	RTE
Campione ambientale	60	1	<i>L. monocytogenes</i>	61	0
Carne, preparazioni a base di carne	24	1	<i>Enterobacteriaceae</i> Conta UFC	25	16
Frutta, cereali e vegetali	21	0	-	21	16
Latte e derivati	19	0	-	19	19
Pesce e prodotti ittici	4	0	-	4	4
Uova	5	0	-	5	0
Misto	36	1	<i>S. Typhimurium</i> 4,12:i:1,2 O:4 (B)	37	31
Altro	1	0	-	1	0
Totale	170	3	-	173	86

Nel 2023 non sono stati confermati link epidemiologici tra campioni alimentari/ambientali e isolati umani. Tuttavia è stato identificato un cluster di 33 casi di salmonellosi da *S. Stanley* confermati tramite sequenziamento (ID 18), di 4 casi di salmonellosi da *S. Enteritidis* con altri casi registrati nelle Marche (ID 24 e ID 25) ed, infine, è stato confermato il link epidemiologico tra un caso di listeriosi (1/2a, ST451) notificato dall'Ospedale San Camillo di Roma ed un cluster di casi di listeriosi dovuti ad un'infezione nosocomiale notificati nel 2020 e nel 2021 dall'Ospedale Santa Maria Goretti di Latina (ID 29).

Indagine ID 19: caso di listeriosi con meningite in paziente anziano e possibile link (non confermato) con *L. monocytogenes* isolata da un esercizio commerciale, luglio 2023

Questa indagine è stata avviata dopo la diagnosi di un caso di listeriosi, esitato in meningite, in un paziente anziano residente in provincia di Roma, ricoverato presso il Campus Biomedico di Roma e trasferito successivamente nel reparto di rianimazione dell'INMI Spallanzani di Roma. Nel mese di luglio la ASL Roma 6 ha disposto il campionamento di alimenti presenti nel frigorifero dell'abitazione del paziente (prosciutto e formaggi), tuttavia non sono state riscontrate positività per *L. monocytogenes* dopo le analisi eseguite presso l'IZSLT. Il giorno successivo l'ACL ha disposto un ulteriore campionamento presso un esercizio commerciale frequentato dal paziente. Le analisi sui campioni alimentari (soppressata e mortadella) hanno avuto esito negativo, mentre dai 10 tamponi, effettuati sulle superfici del reparto salumeria dell'esercizio, il campione effettuato su una delle due affettatrici presenti ha condotto all'isolamento di un ceppo appartenente al sierotipo 1/2b e al ST5, sovrapponibili a quelli dell'isolato di *L. monocytogenes* del liquor del paziente. Il LRMTA ha eseguito analisi WGS sul ceppo umano e ambientale per verificare un possibile link genetico, ma le 14 distanze alleliche (soglia di cut off=7) tra l'isolato umano e quello identificato dall'affettatrice hanno definitivamente escluso tale possibilità.

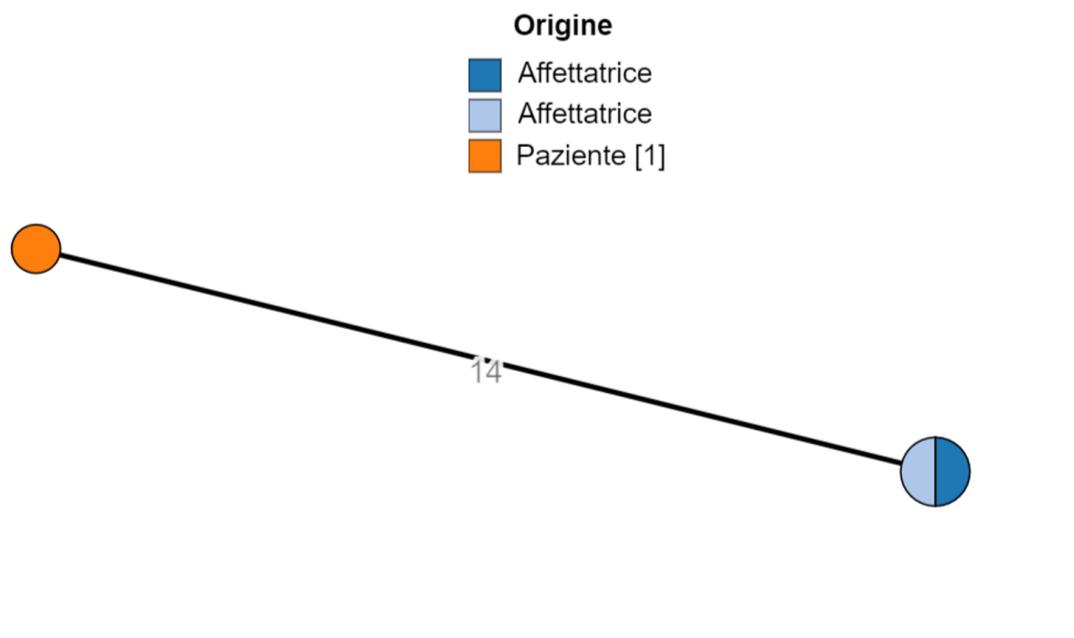


Figura 1. Rappresentazione grafica delle relazioni del cgMLST. L'appartenenza a due cluster genici distinti è confermata dal numero di distanze alleliche tra i diversi isolati analizzati, che risultano superiori al cut-off di riferimento indicato dall'istituto Pasteur (pari a 7).

Indagine ID 18: Focolaio di salmonellosi (*S. Stanley*) legato alla frequenza di diverse mense scolastiche in provincia di Roma, maggio-luglio 2023

L'indagine è stata avviata dopo la segnalazione da parte del SISP (Servizio Igiene e Sanità Pubblica) della ASL Roma 5 di un focolaio di salmonellosi verificatosi nella provincia di Roma. I casi si sono tutti verificati in bambini frequentanti tre diverse scuole. Dall'indagine si è evinto che le mense delle scuole sopracitate venivano rifornite dallo stesso centro di cottura.

L'esordio dei sintomi nei bambini è stato segnalato a partire dal 25/05/2023, per un totale di 33 bambini infetti, di cui alcuni ricoverati con sintomatologia gastroenterica. I patogeni isolati dalle coproculture dei pazienti sono stati identificati tutti come *Salmonella* spp. dai diversi laboratori di microbiologia presso cui i campioni sono stati analizzati. IL CREP ha tipizzato tutti i ceppi, inviati dai suddetti laboratori, riportando la loro appartenenza al sierotipo *S. Stanley*. Il sierotipo *S. Stanley*, come riportato dal CRNS (Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi) dell'IZS delle Venezie e dal coordinamento della rete Enternet Italia dell'ISS, ha una diffusione molto limitata sul territorio italiano e perlopiù circostanziata a campioni di origine animale e non alimentare.

Dopo il verificarsi dei primi casi, il SIAN territoriale competente si è recato presso il suddetto esercizio di ristorazione collettiva per il prelievo di campioni alimentari e ambientali (tamponi di superfici); è stato, altresì, comunicato al Legale Rappresentante della ditta l'elenco degli operatori addetti alla cucina da sottoporre ad esame colturale delle feci. I campioni sono stati inviati presso i laboratori dell'ARPA Lazio di Roma; una volta analizzati, sono risultati tutti negativi per la presenza di *Salmonella* spp., eccezion fatta per un campione alimentare (bistecca di mare). Il ceppo isolato dall'alimento è stato successivamente trasmesso dall'ARPA Lazio al CREP ed è risultato

appartenente al sierotipo *S. Typhimurium* 4,12: i :1,2 O:4 (B), escludendo di fatto un link con i casi delle scuole. Dalle coprocolture sugli operatori della ditta, invece, è stata individuata un'ulteriore positività per *S. Stanley*.

Riepilogando, per quanto riguarda gli isolati di *S. Stanley*, il CREP ha collezionato un totale di 44 ceppi da 35 casi (33 bambini e 1 adulto e 1 addetto del centro cottura). Data la rarità del sierotipo, sono stati selezionati 4 isolati (3 bambini e l'addetto del centro di cottura) per le analisi di caratterizzazione genomica profonda tramite sequenziamento WGS. I 4 isolati sono risultati tutti appartenenti al Sequence Type 29 (ST 29). Le successive analisi di cgMLST e degli SNPs hanno mostrato l'assenza di differenze alleliche e di polimorfismi a singolo nucleotide, supportando i link epidemiologici e confermando l'appartenenza allo stesso cluster genetico.

Discussione dei risultati ottenuti

Il presente report descrive con approccio retrospettivo per gli anni 2022 e 2023, 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 negli anni 2022 e 2023 e nel triennio precedente (Grafico 1).

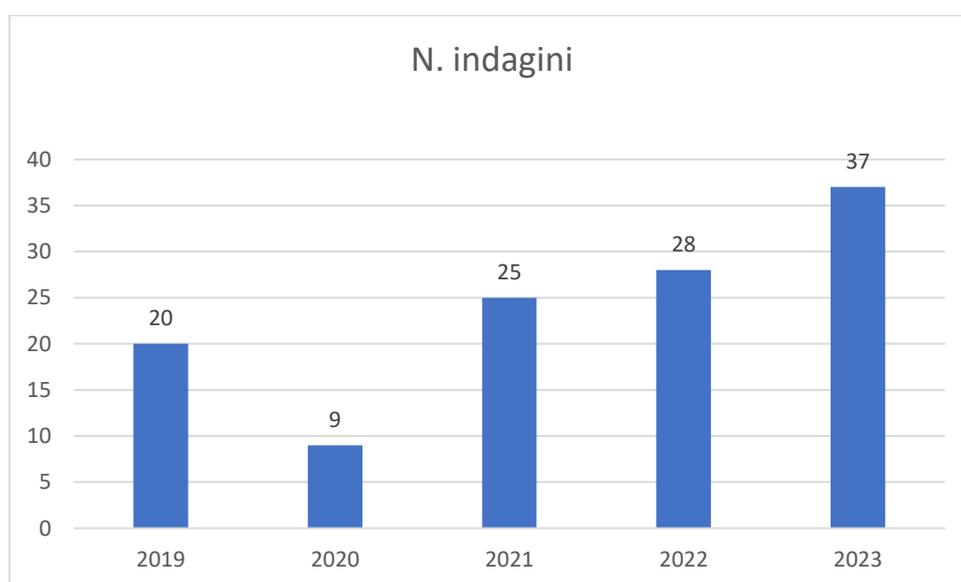


Grafico 1. Numero di indagini epidemiologiche trattate nella regione Lazio dal 2019 al 2023. Il numero indicato fa riferimento ai casi per cui sono state eseguite prove microbiologiche su campioni alimentari o ambientali pervenuti presso l'IZSLT.

Un dato già evidenziato nel precedente report è rappresentato dal decremento di casi registrato nell'anno 2020 (9 rispetto ai 20 del 2019), 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.). Nel 2021 e 2022 è stato registrato un leggero incremento nel numero delle indagini per raggiungere il

numero di 37 indagini nel 2023 (quasi il doppio rispetto a quelle effettuate prima della pandemia). Anche nell'anno in corso si conferma il trend positivo, con il primo semestre che conta già 18 indagini e ulteriori 11 indagini registrate nel solo mese di luglio 2024.

Nella Tabella 4 si riepiloga il numero di ceppi isolati nella regione Lazio negli anni 2022 e 2023 conferiti all'IZSLT.

Tabella 4. Numero di isolati di origine umana conferiti al CREP/LRPTAU nel 2022 e 2023 da strutture ospedaliere e laboratori privati del Lazio.

Patogeno	Numero isolati 2022	Numero isolati 2023
<i>Salmonella</i> spp.	425	500
<i>Listeria monocytogenes</i>	29	35
<i>Campylobacter</i> spp.	206	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	11	7
<i>Escherichia coli</i> STEC	3	3
<i>Shigella</i>	4	3
<i>Vibrio cholerae</i>	1	2

Come riportato, nonostante l'apprezzabile incremento dei casi di sospetta MTA in cui è stato coinvolto l'IZSLT a partire dall'anno di istituzione del LRMTA, risulta ancora evidente la discrepanza tra quest'ultimo e l'elevato numero di isolamenti notificati tramite i sistemi di sorveglianza di laboratorio.

Le cause di tale differenza possono essere in parte attribuite a una non uniformità procedurale da parte dei servizi territoriali delle ASL. Si evidenzia, in aggiunta, che non tutti i singoli casi diagnosticati di MTA sono seguiti da indagini epidemiologica da parte delle Autorità Competenti Locali. 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 (es: casi di listeriosi) o per sospetti focolai di infezione.

Le prove microbiologiche effettuate sui campioni prelevati negli anni 2022 e 2023, hanno fatto registrare una positività per la presenza di patogeni a trasmissione alimentare rispettivamente pari al 10,5% e all'1,6% nei campioni ambientali (rispetto al 16,7% nel 2021) e al 7,8% e all'1,8% nei campioni alimentari (rispetto all'8,9% nel 2021). Gli agenti patogeni più comunemente rilevati sono risultati *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* e *Salmonella* spp. Nell'ambito delle indagini regionali condotte, 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 risulta molto bassa. Infatti, solo in un'indagine (ID 18 nel 2022) è stato evidenziato un effettivo link genetico tra isolati alimentari/ambientali ed isolati clinici.

Nel caso dell'indagine ID 18 del 2023 (focolaio di *Salmonella* Stanley), dall'analisi della curva epidemiologica, la ASL di competenza ha concluso che non si trattava probabilmente di una sorgente contaminazione puntiforme, bensì di un'esposizione prolungata nel tempo, verosimilmente legata a condotte igienico comportamentali non consone da parte degli operatori del centro cottura. Tuttavia quest'indagine ha rappresentato un eccellente caso di gestione tempestiva e concertata di un focolaio di MTA da parte di diverse istituzioni e professionalità (Dipartimento di Prevenzione della ASL Roma 5, Ospedali, Laboratori Privati, Pediatri di libera scelta, Dirigenti Scolastici, Seresmi, IZSLT e ARPA Lazio).

In generale, 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).

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 Locali 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.

Vanno inoltre considerati 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 i quantitativi di materiale campionato, soprattutto quando si tratta di un alimento residuo del pasto oggetto di indagine, siano inadeguati e inferiori a quelli riportati 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 rimarkano l'importanza del supporto all'indagine epidemiologica del campionamento ambientale, pratica non sempre seguita dai Servizi territoriali.

Il sequenziamento con metodica NGS continua a costituire uno strumento fondamentale per lo studio dei focolai, la conduzione di indagini epidemiologiche e di analisi 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. Questa metodologia è stata applicata nelle indagini in cui erano disponibili sia gli isolati di origine alimentare e ambientale che quelli di origine umana (es: ID 18 del 2022), per il corretto rintracciamento della probabile fonte di

contaminazione, o per assegnare diversi casi clinici ad un unico cluster epidemiologico, come ad esempio si procede con le analisi condotte di default dalla piattaforma di sorveglianza genomica IRIDA Aries.

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-DGPRE "Sorveglianza e prevenzione della Listeriosi") e quella degli *Escherichia coli* STEC, che risultano supportate dalla suddetta piattaforma gestita 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 Referenza 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 Referenza 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 Referenza 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.

In ottemperanza alla Determinazione Regionale n. G06447 del 28 maggio 2021, all'Atto di organizzazione Regionale n. G12436 del 12 ottobre 2021 e al fine di impostare un adeguato piano di sorveglianza delle MTA durante il Giubileo 2025 nel mese di marzo 2024 si è riunito il Gruppo Regionale per la gestione delle MTA. Nei mesi successivi il Gruppo Regionale ha operato in maniera efficace e collaborativa per portare a compimento l'attività di Revisione ed aggiornamento delle Linee guida per la sorveglianza delle MTA e delle procedure logistico-operative per il funzionamento del sistema di sorveglianza delle MTA. In conclusione, auspichiamo che l'applicazione delle nuove Linee guida consenta in futuro il fattivo superamento di molte delle criticità finora osservate.

Ringraziamenti

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

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.
- Russini V, Spaziante M, Varcasia BM, Diaconu EL, Paolillo P, Picone S, Brunetti G, Mattia D, De Carolis A, Vairo F, Bossù T, Bilei S, De Marchis ML. A Whole Genome Sequencing-Based Epidemiological Investigation of a Pregnancy-Related Invasive Listeriosis Case in Central Italy. *Pathogens*. 2022 Jun 8;11(6):667. doi: 10.3390/pathogens11060667.
- Russini V, Giancola ML, Brunetti G, Calbi C, Anzivino E, Nisii C, Scaramella L, Dionisi AM, Faraglia F, Selleri M, Villa L, Lovari S, De Marchis ML, Bossù T, Vairo F, Pagnanelli A, Nicastrì E. A Cholera Case Imported from Bangladesh to Italy: Clinico-Epidemiological Management and Molecular Characterization in a Non-Endemic Country. *Trop Med Infect Dis*. 2023 May 6;8(5):266. doi: 10.3390/tropicalmed8050266.