

A. Costa¹, A. Gattuso², A. Giammanco³, M. Torresi⁴, V. Alio¹, G. Butera¹, T. Fasciana³,
A. Castello¹, C. Cardamone¹, F. Pomilio⁴

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo; ²Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione, Sanità Pubblica Veterinaria (DSANV), Istituto Superiore di Sanità, Roma; ³Pro.Mi.Se/Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico P. Giaccone, Palermo; ⁴LNR per *Listeria monocytogenes*, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Abruzzo e Molise, Teramo

Introduzione

Listeria monocytogenes (*L.m.*) è l'agente eziologico della listeriosi, una patologia rara ma che si può manifestare con un grave quadro clinico in soggetti predisposti come neonati, anziani, donne in gravidanza e adulti immunocompromessi, trasmessa prevalentemente attraverso il consumo di alimenti contaminati. *L.m.* è ubiquitaria, in grado di moltiplicarsi e/o sopravvivere in condizioni di stress quali refrigerazione, acidità, elevata salinità; può contaminare e persistere negli ambienti di produzione e di consumo degli alimenti (Ferreira et al, 2014), rappresentando pertanto un problema significativo, soprattutto nella produzione di alimenti Ready To Eat (RTE) (EFSA 2018). Dati EFSA-ECDC riportano un continuo aumento di casi di *L.m.* negli ultimi anni, soprattutto in particolari fasce di età (>75 anni e donne tra 25 e 44 anni). Dei 13 diversi sierotipi di *L.m.* conosciuti, il sierotipo 1/2a, l'1/2b e il 4b provocano circa il 95% dei casi di listeriosi. I sierotipi 1/2a, 1/2b e 1/2c sono quelli più frequentemente isolati dagli alimenti, mentre il 4b è quello più spesso associato a focolai epidemici. All'interno dell'intera specie, a livello genetico, il Clonal Complex (CC)1, il CC2, il CC4 e il CC6, tutti appartenenti al sierotipo 4b, sono quelli significativamente più comuni tra gli isolati clinici rispetto alla loro prevalenza negli alimenti e sono pertanto definiti iper-virulenti (Maury et al, 2016). Se da una parte la diffusione negli alimenti è nota, dall'altro più difficoltoso è reperire i dati clinici e gli isolati umani, per valutarne la eventuale correlazione. L'applicazione di metodi di caratterizzazione sierologica e molecolare, quali in particolare la Multi Locus Sequence Typing (MLST) e metodiche altamente discriminanti quali il sequenziamento genico (WGS), giocano un ruolo fondamentale per risalire alle fonti di infezione, per la ricostruzione dei circuiti di contagio e la pianificazione di interventi mirati per l'interruzione della catena di trasmissione. La circolare del Ministero della Salute (0008252-13/03/2017-DGPRE-DGPRE) avente per oggetto "Sorveglianza e prevenzione della listeriosi" raccomanda la stretta collaborazione tra i centri epidemiologici regionali per la sicurezza alimentare, i laboratori ufficiali territorialmente competenti (IIZZSS), il Laboratorio di riferimento dell'ISS (Operational Contact Point dell'ECDC per la Listeriosi), operante in ambito umano, e il LNR per la Listeriosi operante in ambito veterinario (IZSAM), affinché raccolgano, aggiornino ed integrino sistematicamente le informazioni epidemiologiche e microbiologiche su *L.m.*, da campioni alimentari/ambientali e da casi umani, al fine di rendere pienamente efficace l'attività di sorveglianza su base nazionale e tempestiva l'azione di prevenzione e controllo della malattia. Scopo del lavoro è stato la caratterizzazione sierologica e molecolare dei ceppi di *L.m.* isolati da matrici alimentari e dall'uomo nel periodo 2019-2021 in Sicilia.

Materiali e metodi

Nel triennio 2019-2021, presso i laboratori di Microbiologia degli alimenti dell'IZS Palermo sono stati isolati (UNI EN ISO 11290-1:2017) un totale di 67 ceppi di *L.m.* da diverse matrici alimentari, quali: prodotti lattiero-caseari (formaggi a pasta filata, ricotta), a base di carne (freschi e preparati), ittici (affumicati, insalate di mare), vegetali (preconfezionati) prelevati nell'ambito di campionamenti dei Servizi Veterinari delle ASP. Gli isolati batterici sono stati conservati a -20°C in Microbank e di seguito inviati al LNR per *L.m.* dell'IZSAM sede di Teramo, per la determinazione del sierogruppo (PCR-Multiplex) e successiva indagine molecolare (MLST e Whole Genome Sequencing -WGS). Il sequenziamento è stato effettuato su piattaforma NextSeq 500 Illumina e l'analisi dei dati eseguita su una piattaforma bioinformatica e di raccolta dati del LNR per *L.m.*, denominata GenPat. Nello stesso periodo, presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico, sono stati collezionati n. 39 ceppi clinici di *L.m.* da laboratori ospedalieri di Palermo. I ceppi clinici, insieme alle schede per la raccolta dei dati epidemiologici, sono stati inviati all'Istituto Superiore di Sanità (ISS), DSANV, in quanto Operational Contact Point microbiologico per *L.m.* in Italia nel network FWD-ECDC, per la caratterizzazione molecolare mediante WGS. Il sequenziamento è stato effettuato su una piattaforma IonTorrent S5 e l'analisi è stata eseguita automaticamente su una piattaforma bioinformatica e di raccolta dati dei ceppi clinici, denominata IRIDA (Integrated Rapid Infectious Disease Analysis)-ARIES (Advanced Research Infrastructure for Experimentation in genomics). Per valutare con maggior potere discriminante le correlazioni genetiche esistenti tra i ceppi isolati, individuando eventuali cluster di infezione (cluster analysis) ed effettuando considerazioni di tipo epidemiologico, è stata utilizzata la core genome MLST (cgMLST) (Moura et al., 2016).

Risultati

I risultati dell'analisi in PCR Multiplex per la determinazione del sierogruppo eseguita sui 67 isolati di *L.m.* da alimenti mostrano una prevalenza del sierogruppo IVb (70%) rilevato in tutte le matrici esaminate, seguito dal IIa (24%) e dal IIb (4.5%), quest'ultimo identificato in prodotti ittici (salmone affumicato); un solo ceppo, isolato da salsiccia suina, è risultato appartenere al sierogruppo IIC (1.5%) (Fig. 1 e Tabella 1). La caratterizzazione molecolare degli isolati di *L.m.* da alimenti eseguita dal LNR, ha permesso di identificare 12 MLST Clonal Complex (CCs) mostrando un'elevata eterogeneità della popolazione batterica studiata, dal punto di vista genetico: 38 ceppi sono stati caratterizzati come CC2 (56.7%), 5 CC1 (7.5%), 5 CC199 (7.5%) e 4 CC6 (6%). I risultati del sequenziamento hanno evidenziato l'esistenza di cluster di ceppi appartenenti al Clonal Complex (CC) 2, CC199 e CC1 (Fig 2). In particolare, tra i prodotti a base di latte, il 46.3% dei ceppi, tutti appartenenti al sierogruppo IVb, isolati da mozzarella e formaggio a pasta filata, prelevati presso una stessa azienda produttrice, durante controlli ufficiali, nel periodo agosto-settembre 2020 (a seguito di positività rilevata in autocontrollo), e in un successivo campionamento a gennaio 2022, appartenevano al Clonal Complex (CC) 2 e Sequence Type 2 (ST2). I risultati della caratterizzazione molecolare dei 39 ceppi clinici di *L.m.* mostrano la prevalenza del sierogruppo IVb (89.7%) e del Clonal Complex (CC) 2 (32/39,82,1%), seguito dal CC1 (2/39,5,1%) e CC6 (1/39,2,6%). Le indagini molecolari dei ceppi di *L.m.* oggetto dello studio sono riportate in Tabella (1-2): dai risultati si evince che sierogruppo IVb ed il CC2/ST2 sono stati rilevati più di frequente sia da fonti alimentari che umane nel periodo considerato. L'analisi filogenetica dei genomi dei 39 isolati clinici di *L.m.* ha consentito l'identificazione di un Cluster_90 composto da 25 ceppi dei quali 6 isolati nel 2019, 16 nel 2020 e 1 nel 2021 mentre per due ceppi non si conosce l'anno di isolamento. I 25 ceppi sono risultati appartenere al sierogruppo IVb, ST2 e CC2 presentando tra loro una differenza allelica al core genome MLST compresa tra 0 e 12. Da sottolineare la presenza di 8 ceppi, isolati tra ottobre 2019 e agosto 2021, associati a casi materni neonatali. Le sequenze genomiche dei 39 ceppi clinici di *L.m.* sono state confrontate con le sequenze depositate nel database IRIDA-ARIES. Dall'analisi è emerso che al Cluster_90, ST2 appartenevano anche 3 ceppi isolati in Lombardia (2 nel 2019, 1 nel 2020), 2 in Piemonte, 1 nel Lazio, 1 in Toscana nel 2020 e 2 ceppi isolati in Sicilia (1 nel 2019 da Siracusa e 1 nel 2020 dalla provincia di Palermo).

Conclusioni

L'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) ha inserito la listeriosi fra le malattie prioritarie da sottoporre a sorveglianza "rafforzata" anche attraverso l'approccio di laboratorio che prevede la tipizzazione degli isolati clinici di *L. monocytogenes*. Si tratta di una sorveglianza volontaria alla quale partecipano: i Laboratori di Riferimento Regionali per la sorveglianza clinica, gli IIZZSS, i Laboratori del Servizio Sanitario Nazionale (SSN), gli Istituti Universitari e le Regioni. Il presente studio ha permesso di avviare la costruzione di una rete integrata medico/veterinaria tra laboratori per potenziare il sistema di sorveglianza della listeriosi nella regione Sicilia.

Progetto Finanziato dal Ministero della Salute RC IZS SI 07/19

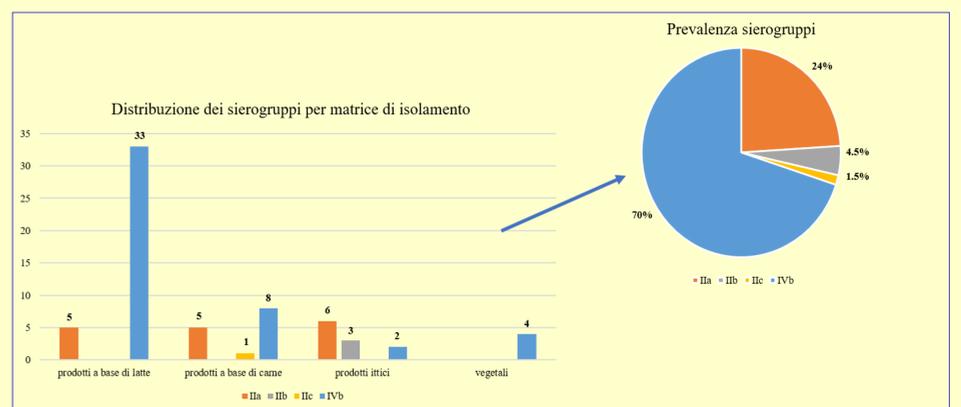


Fig 1 Distribuzione e prevalenza dei sierogruppi di *L. monocytogenes* identificati nei campioni di alimenti

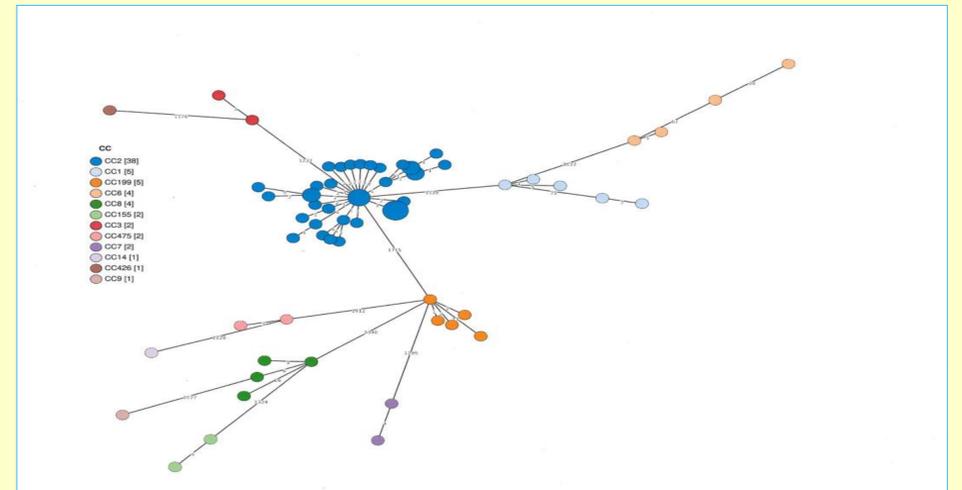


Fig 2 Grape tree Clonal Complex (CC) ceppi da alimenti

Sierogruppo	Alimenti	%	Casi di listeriosi	%
IIa	16	24%	4	10.3%
IIb	3	4.5%	-	-
IIC	1	1.5%	-	-
IVb	47	70%	35	89.7%
tot	67		39	

Tabella 1 Prevalenza dei sierogruppi di *L. monocytogenes* isolata da alimenti e da casi clinici di listeriosi

Clonal Complex (CC)	Sequence Type (ST)	Alimenti	Casi di listeriosi
CC1	ST1	5	2
CC2	ST2	38	32
CC3	ST3	2	-
CC6	ST6	4	1
CC7	ST7	2	-
CC8	ST8	4	-
CC9	ST9	1	-
CC14	ST14	1	-
CC29	ST29	-	1
CC155	ST155	2	3
CC199	ST199	5	-
CC426	ST426	1	-
CC475	ST504	2	-
		67	39

Tabella 2 Caratterizzazione molecolare di *L. monocytogenes* isolata da alimenti e da casi clinici di listeriosi

Bibliografia

EFSA Scientific Opinion *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. EFSA Journal 2018 16(1):5134; EFSA- ECDC The European Union One Health 2018 zoonoses report. EFSA J. 2019, 17, 5926; Ferreira et al. (2014) *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. J Food Prot 77:150-170; Gianfranceschi et al. (2009). Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002-2005) Food Microbiol 26:520-526; Lomonaco et al. (2015). The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. Infect. Genet. Evol 35:172-183; Maury et al (2016) Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. Nature Genetics, 48(3), 308-313; Moura et al. (2016). Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. Nat. Microbiol. 2:16185; Salcedo et al. (2003) Development of a Multilocus Sequence Typing Method for Analysis of *Listeria monocytogenes* Clones. J Clinical Microbiol 41(2):757-62; Torresi et al. (2020) A real-time PCR screening assay for rapid detection of *Listeria monocytogenes* outbreak strains. Foods, 9: 67