



Istituto Superiore di Sanità
Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria
UO Sicurezza Microbiologica degli Alimenti e Malattie a Trasmissione Alimentare

**Primo report sulle attività di sorveglianza di laboratorio della listeriosi in Italia basata
sul sequenziamento genomico degli isolati
Periodo di riferimento anni 2018 -2019**

Monica Virginia Gianfranceschi, Gianni Ciccaglioni*, Alfonsina Fiore*, Antonietta Gattuso*,
Marco Francesco Ortoffi*, Valeria Michelacci*, Arnold Knijn*, Gaia Scavia*, Manuela Marra**,
Maria Carollo**, Stefano Morabito*.*

**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria*

***Servizio Grandi Strumentazioni e Core Facilities – Area NGS*

Premessa

In seguito ad un esteso focolaio di listeriosi umana verificatosi in Italia centrale nel corso del 2015 e nei primi mesi del 2016, il Ministero della Salute ha emesso, nel marzo 2017, la nota circolare “Sorveglianza e prevenzione della Listeriosi” (0008252-13/03/2017-DGPRES-DGPRES-P) che raccomanda l’invio degli isolati clinici, relativi a casi di listeriosi, all’Istituto Superiore di Sanità (Operational Contact Point dell’ECDC per la listeriosi) per la loro tipizzazione. Tale iniziativa si è mostrata perfettamente aderente alla decisione dell’European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) di inserire la listeriosi fra le malattie prioritarie da sottoporre a sorveglianza “rafforzata” anche attraverso l’approccio di laboratorio (tipizzazione sierologica e molecolare degli isolati clinici di *Listeria monocytogenes*).

In quest’ottica, il Programma CCM – Azioni Centrali “Analisi Epidemiologica di tre malattie orfane: *Trichinella*, *Listeria*, *Echinococcus*” (febbraio 2017- febbraio 2019) ha inteso valutare la necessità e la fattibilità dell’istituzione di un sistema nazionale di sorveglianza per le infezioni da *L. monocytogenes*, prefiggendosi, fra gli obiettivi, la valutazione della capacità operativa dei laboratori microbiologici. L’applicazione della circolare ministeriale e le attività inerenti all’azione centrale hanno permesso di verificare che le tecniche di tipizzazione di *L. monocytogenes*, in particolare, della *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) in uso presso i laboratori territoriali, potevano essere nettamente migliorate grazie all’applicazione di metodi di caratterizzazione molecolare degli isolati basati sul sequenziamento dell’intero genoma (Whole Genome Sequencing, WGS), come del resto già auspicato dall’ECDC che sollecitava gli Stati Membri a sostituire la PFGE con WGS, a partire dal 2018.

La presenza presso l’Istituto Superiore di Sanità (ISS) di un servizio centralizzato di sequenziamento e lo sviluppo della piattaforma IRIDA-ARIES (<https://irida.iss.it>), per la raccolta e l’analisi delle sequenze genomiche, ha consentito all’Italia di completare rapidamente la transizione dalla PFGE al WGS relativamente agli isolati clinici di *L. monocytogenes*.

Introduzione

L’obiettivo di questo primo report è quello di condividere con i Laboratori di Riferimento Regionali per la sorveglianza clinica, i Laboratori Ospedalieri, le Regioni e il Ministero della Salute i risultati della sorveglianza epidemiologica e di laboratorio della listeriosi, effettuata sul territorio nazionale, durante il periodo 2018-2019. I dati utilizzati in questo report sono quelli raccolti nella piattaforma IRIDA-ARIES.

Per la sottomissione e consultazione dei dati di sequenza è stato previsto il rilascio agli utenti di credenziali di accesso, previa autorizzazione da parte delle autorità competenti regionali. Gli utenti autorizzati possono consultare e scaricare i dati (sequenza WGS, sierogruppo e determinanti di virulenza) relativi agli isolati della propria regione e confrontare le sequenze genomiche con quelle dei ceppi circolanti in altre regioni. Nel mese di ottobre del 2019, sono stati organizzati, per gli utenti, due eventi formativi per illustrare le modalità operative per l’utilizzo della piattaforma IRIDA-ARIES.

1. Utenti IRIDA - ARIES

In Tabella 1 sono elencati gli utenti che hanno ottenuto dalle regioni l'autorizzazione alla sottomissione e alla consultazione dei dati di sequenza e gli utenti che, tra questi, hanno richiesto le credenziali per l'accesso al data-base IRIDA-ARIES predisposto ed installato presso l'ISS (<https://irida.iss.it>).

Tabella 1. Elenco regioni, utenti autorizzati e utenti con credenziali di accesso

Regioni	Utenti autorizzati dalla Regione	Utenti che hanno richiesto le credenziali
Emilia-Romagna	2	2
Lazio	8	6
Lombardia	2	2
Marche	2	2
Piemonte	4	2
Puglia	3	3
Sicilia	16	6
Trentino-Alto Adige	4	2
Umbria	3	3
Valle d'Aosta	2	0

2. Isolati clinici di *L. monocytogenes* e notifiche dei casi di listeriosi (2018-2019)

Nel 2018 sono stati inviati all'ISS 197 isolati clinici da 13 regioni (Tabella 2). Fra le 7 regioni che non hanno inviato isolati, solo 3 (Molise, Valle d'Aosta e Sicilia) non hanno notificato casi di listeriosi. Le regioni Emilia-Romagna, Lombardia e Piemonte hanno inviato il 62,9% del totale degli isolati clinici. Per la maggior parte delle regioni, il numero delle notifiche dei casi di listeriosi e il numero degli isolati clinici inviati hanno lo stesso ordine di grandezza, fatta eccezione per 2 regioni, Emilia-Romagna ed Umbria, dove a fronte di 47 e 11 isolati clinici, rispettivamente inviati, sono stati notificati 1 e 0 casi.

Tabella 2. Isolati clinici di *L. monocytogenes* e notifiche di casi di listeriosi (2018).

*Dati dal Sistema informativo delle malattie infettive e diffusive – Ministero della Salute

Regione	N. isolati di <i>L. monocytogenes</i> inviati all'ISS	N. di notifiche di casi di listeriosi*
Abruzzo	1	3
Basilicata	0	1
Calabria	2	1
Campania	4	6
Emilia-Romagna	47	1
Friuli-Venezia Giulia	7	4
Lazio	21	28
Liguria	0	4
Lombardia	54	67
Marche	5	7
Molise	0	0
Piemonte	23	21
Puglia	0	4
Sardegna	0	2
Sicilia	0	0
Toscana	13	13
Trentino-Alto Adige	6	6
Umbria	11	0
Valle d'Aosta	0	0
Veneto	3	19
Totale	197	187

Nel 2019, sono stati inviati all'ISS 216 isolati clinici da 15 regioni (Tabella 3). Le regioni Emilia-Romagna, Lombardia, Piemonte e Veneto hanno inviato più della metà del totale degli isolati clinici (61,6%). Da notare, nel 2019, un notevole incremento del numero degli isolati clinici da parte della regione Lazio (43 nel 2019 vs 21 nel 2018). Per il 2019 i dati relativi al totale dei casi notificati e la suddivisione delle notifiche per regioni non erano ancora disponibili al momento della redazione del presente report.

Tabella 3. Isolati clinici di *L. monocytogenes* e notifiche di casi di listeriosi (2019)

Regione	N. isolati di <i>L. monocytogenes</i> Inviati all'ISS	N. di notifiche di casi di listeriosi*
Abruzzo	1	-
Basilicata	0	-
Calabria	2	-
Campania	5	-
Emilia-Romagna	35	-
Friuli-Venezia Giulia	3	-
Lazio	43	-
Liguria	2	-
Lombardia	57	-
Marche	7	-
Molise	0	-
Piemonte	28	-
Puglia	0	-
Sardegna	0	-
Sicilia	1	-
Toscana	13	-
Trentino-Alto Adige	1	-
Umbria	5	-
Valle d'Aosta	0	-
Veneto	13	-
Totale	216	-

* per il 2019 il totale dei casi di listeriosi notificati e le notifiche dei casi suddivise per regioni non era disponibile al momento della redazione del report.

3. Informazioni epidemiologiche sui casi di listeriosi

Per la maggior parte degli isolati clinici sono state fornite le informazioni sul paziente relativamente all'età, al sesso, alla residenza, al quadro clinico e ai fattori di rischio. I metadati epidemiologici sono trasferiti nel database IRIDA- AIREs in forma anonimizzata (senza riferimenti all'identificazione del paziente) e con l'aggregazione delle informazioni sulla residenza a livello di Regione. Dall'analisi dei dati epidemiologici disponibili, raccolti a livello nazionale, si osserva che il 50,5% del totale dei casi di listeriosi riportati attraverso l'invio del ceppo all'ISS nel 2018 e nel 2019, interessa individui di età superiore ai 65 anni. In particolare, la fascia di età compresa tra i 76 e i 90 anni, rappresenta il 60,7% dei casi al di sopra dei 65 anni, con una prevalenza del sesso maschile. Nel 70% dei casi riportati, la manifestazione clinica è stata la setticemia. Oltre all'età avanzata, che rappresenta un noto fattore di rischio per la listeriosi, molti pazienti

presentavano anche concomitanti condizioni patologiche, soprattutto tumori e insufficienza epatica/renale. Il numero di decessi tra i pazienti con listeriosi è rimasto stabile nei due anni considerati, con una percentuale di letalità del 5,5% nel 2018 e del 5,3% nel 2019. Si tratta di un dato inferiore a quello riportato in EU nel 2018 (15,6% secondo il summary report EFSA/ECDC, 2019). È necessario tener presente che il decorso clinico della malattia non è facile da seguire in quanto il trasferimento dei pazienti in altri reparti rende difficoltoso per i laboratori di riferimento regionali e per gli stessi laboratori ospedalieri rintracciare tale tipo di informazione. Lombardia e Piemonte sono le regioni con la più elevata capacità di raccogliere tale dato; nello specifico nella regione Lombardia si sono verificati 10 decessi a fronte di 107 pazienti con isolato inviato all'ISS e per i quali sono state raccolte le informazioni epidemiologiche (9,3%) e nella regione Piemonte, 5 decessi a fronte di 47 isolati (10,6%).

A livello nazionale, i casi materno-neonatali (MN) di listeriosi identificati sono stati 35 nel periodo in esame (17 nel 2018 e 18 nel 2019). A livello regionale, limitatamente alle regioni più rappresentative come numero di isolati inviati e che hanno fornito informazioni epidemiologiche complete (Lazio, Lombardia e Piemonte), Lazio e Lombardia sono le regioni nelle quali sono stati diagnosticati più casi MN (12 nel 2018 e 9 nel 2019).

4. Raccolta dati di genomica degli isolati clinici di *L. monocytogenes*

La piattaforma IRIDA-ARIES comprende, al momento della pubblicazione del report, 475 sequenze genomiche di *L. monocytogenes* provenienti da casi clinici, verificatesi in Italia, tra il 2010 e il 2019. Di queste, 320 si riferiscono agli anni 2018 (139) e 2019 (181). Delle 320 sequenze, 33 sono state effettuate sul territorio e inserite nella piattaforma IRIDA-ARIES direttamente dagli utenti delle regioni Emilia-Romagna (3), Lazio (17), Lombardia (10), Piemonte (1) e Toscana (2), le restanti 287 sequenze (134 nel 2018 e 153 nel 2019) sono state effettuate e inserite nella piattaforma dall'ISS. Relativamente alla sottomissione delle sequenze prodotte sul territorio, viene seguita una politica diversa a seconda delle regioni: l'Emilia-Romagna sottomettete solo le sequenze relative alla segnalazione di un cluster in cui la regione è risultata coinvolta (2 sequenze nel 2018 e 1 sequenza nel 2019), mentre le Regioni Lazio, Lombardia, Piemonte e Toscana sottomettono alla piattaforma IRIDA-ARIES tutte le sequenze disponibili.

Va sottolineato che il totale degli isolati clinici pervenuti in ISS negli anni 2018-2019 (tabelle 2 e 3), è di 413 ceppi, a fronte di 320 sequenze genomiche presenti nella piattaforma IRIDA-ARIES (320). Questa discrepanza è dovuta al fatto che 23 isolati sono pervenuti in ISS oltre il termine stabilito per l'inserimento dei dati nel presente report, mentre per 70 isolati si era in attesa dell'invio delle sequenze prodotte sul territorio.

5. Risultati dell'analisi genomica

Le analisi dei dati di genomica sono innescate automaticamente all'atto della sottomissione e i relativi risultati prodotti (metadati analitici) popolano automaticamente una tabella interrogabile dall'utente.

Di seguito sono riportati i risultati delle analisi di tipizzazione molecolare effettuati dalla piattaforma IRIDA-ARIES relativi agli isolati clinici degli anni 2018 e 2019.

5.1 Controllo di qualità

Al momento della sottomissione dei dati nella piattaforma IRIDA-ARIES, il software esegue un controllo di qualità dei dati di sequenziamento basato sulla determinazione della i) profondità di sequenziamento, ii) copertura in profondità e in lunghezza dei geni dello schema MLST (7 geni). La combinazione di questi parametri genera un "flag" contrassegnato dai termini "passed" per le sequenze con profondità di lettura > di 100x e con copertura dei geni MLST del 100% con profondità maggiore o uguale a 30x e "failed" per quelle che non soddisfano uno tra questi due parametri. In Figura 1 viene mostrata la distribuzione dei parametri di qualità relativi alle sequenze dei ceppi isolati negli anni in esame.

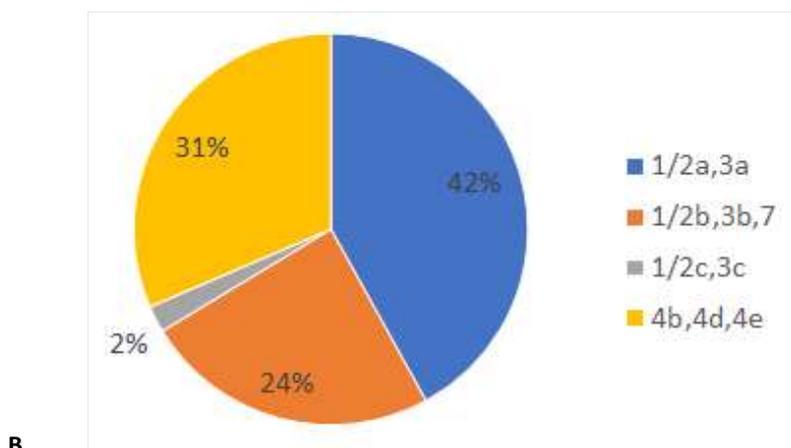
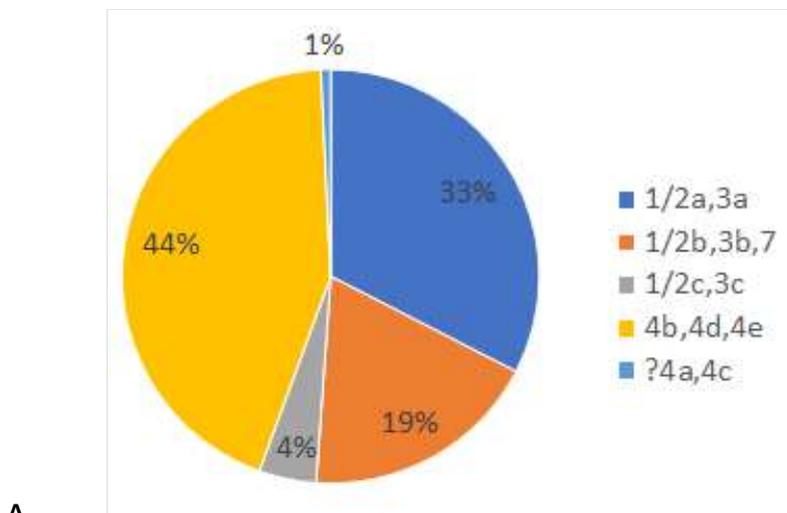
Figura 1. Controlli di qualità sulle sequenze relative agli isolati Clinici di *L. monocytogenes* nel 2018 (A) e nel 2019 (B)



5.2 Sierogruppi

Nel 2018 i sierogruppi prevalentemente associati ai casi di listeriosi riportati all'ISS sono stati 4b,4d,4e (44%) e 1/2a,3a (33%) (Figura 2 A). Anche a livello regionale, limitatamente alle 3 regioni più rappresentative come numero di isolati clinici inviati (Emilia-Romagna, Lombardia e Piemonte) prevalgono gli stessi due sierogruppi. Interessante notare come in Piemonte la percentuale del siero gruppo 4b,4d,4e risulta essere il doppio rispetto a quella del sierogruppo 1/2a,3a (Figura 3 A).

Figura 2. Distribuzione dei sierogruppi di *L. monocytogenes* identificati mediante analisi genomica nel 2018 (A) e nel 2019 (B)

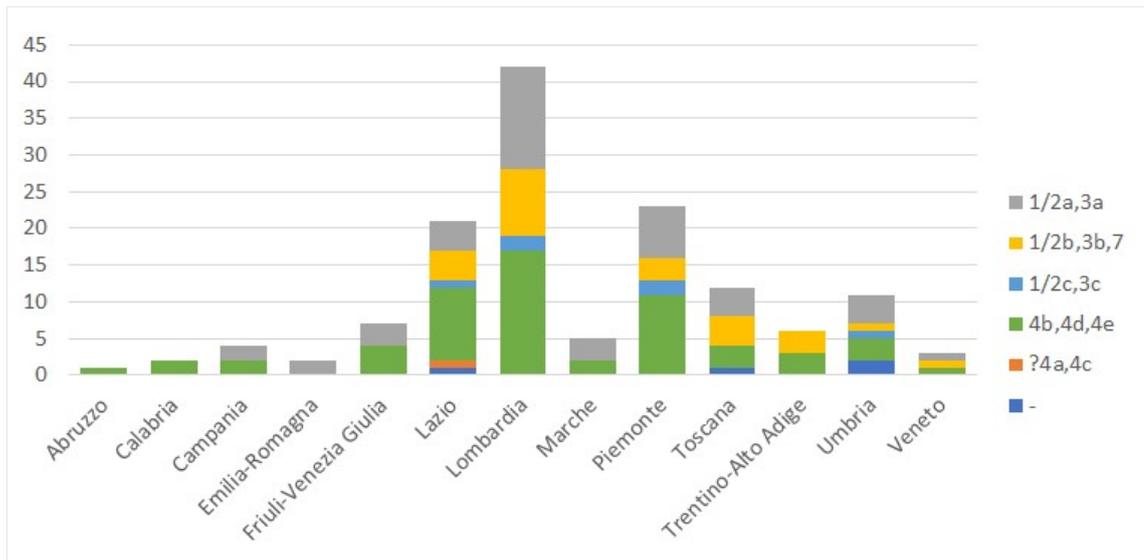


Anche nel 2019 i sierogruppi prevalentemente associati ai casi di listeriosi riportati all'ISS sono stati 4b,4d,4e e 1/2a,3a, ma con prevalenza del sierogruppo 1/2a,3a (42%), rispetto al sierogruppo 4b,4d,4e (31%) (Figura 2 B). Anche a livello regionale, limitatamente alle regioni che

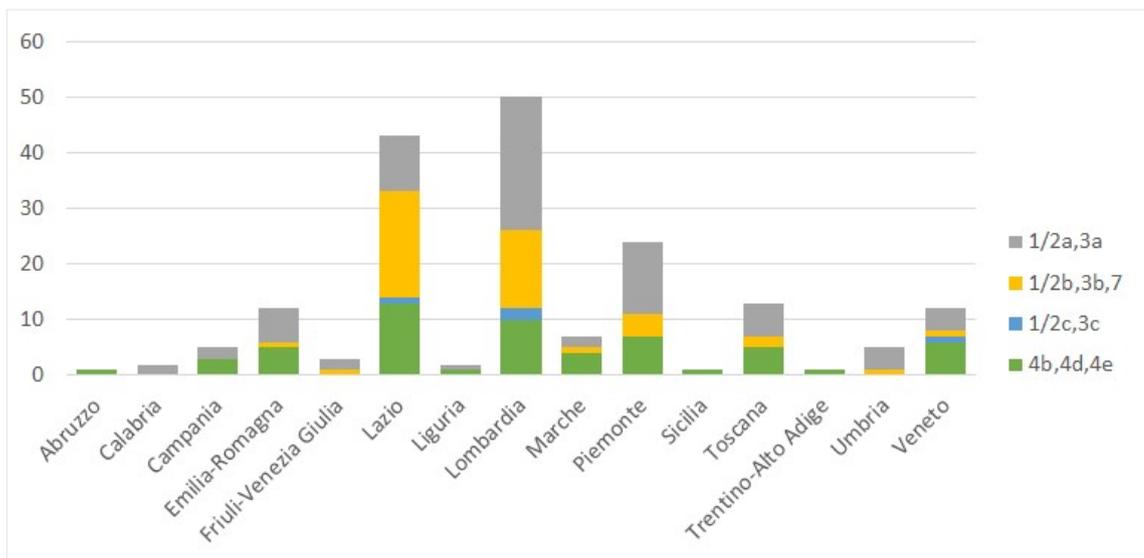
hanno inviato il maggior numero di isolati clinici (Emilia-Romagna, Lazio, Lombardia e Piemonte) si nota una simile prevalenza (Figura 3 B). Interessante notare che nella Regione Lazio nel 2019, ben il 44% dei casi di listeriosi era associato al sierogruppo 1/2b, 3b,7.

In generale, non si è osservata una specificità di alcuni sierogruppi verso una particolare manifestazione clinica.

Figura 3. Distribuzione dei sierogruppi degli isolati clinici di *L. monocytogenes* nel 2018 (A) e nel 2019 (B). Dati divisi per regione di provenienza.



A

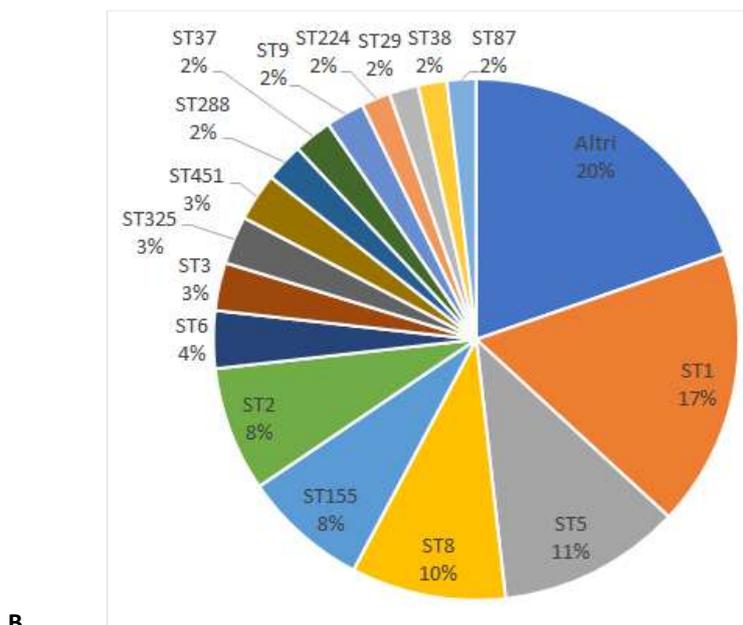
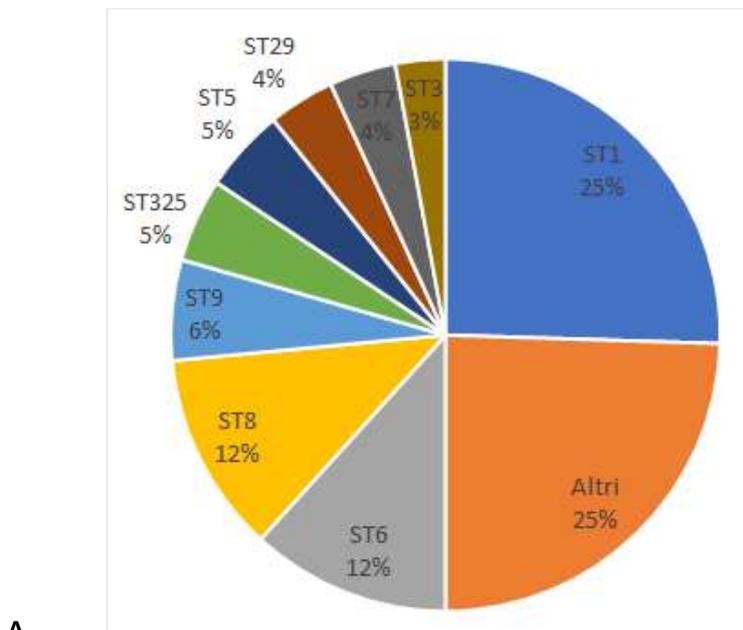


B

5.3 Sequence Types (ST)

Gli isolati clinici di *L. monocytogenes* nel 2018 risultano distribuiti prevalentemente fra tre diversi "sequence types", ST1, ST6 ed ST8 (Figura 4A), distribuzione che ritroviamo soprattutto in tre Regioni: Lazio, Lombardia e Piemonte.

Figura 4. Distribuzione percentuale nei diversi ST degli isolati clinici di *L. monocytogenes* nel 2018 (A) e nel 2019 (B)



Nel 2019 ST1, anche se prevalente, mostra una diminuzione rispetto al 2018 (17% vs 25%); lo stesso comportamento viene osservato per il ST6 (12% vs 4%). Pressoché stabile ST8. Nel 2019 viene osservato un aumento del ST5 che passa dal 5% nel 2018 all' 11% nel 2019, soprattutto nella regione Lazio.

L'aumento del ST5 deve essere monitorato con attenzione in quanto, in base a recenti dati di letteratura (Muhterem-UyaretM. et al., 2018; Naditz A.L. et al. 2019), gli isolati clinici appartenenti a questo "sequence type" sono caratterizzati da elevata resistenza a fattori ambientali estremi e possono quindi essere di difficile eradicazione dagli impianti di produzione degli alimenti rappresentando conseguentemente una continua fonte di contaminazione degli alimenti.

5.4. Analisi dei cluster genomici

Un cluster di isolati clinici è definito come un gruppo di due o più genomi di *L. monocytogenes* che differiscono per non più di sette differenze alleliche sul totale del "core genome" della specie che conta in totale 1.748 geni. Questa misura identifica un grado di correlazione tra isolati clinici che può indicare un'origine clonale e che pertanto deve essere approfondita a livello epidemiologico.

L'analisi filogenetica dei genomi degli isolati clinici relativi all'anno 2018 comparati con tutti i dati presenti nel database (dal 2010) ha consentito l'identificazione di 25 cluster. Cinque di questi (cluster 1, 3, 5, 6 e 11) hanno coinvolto da 11 a 30 isolati clinici e hanno avuto un'estesa diffusione geografica, coinvolgendo fino a 8 regioni, ed un'ampia persistenza temporale (3-7 anni) (Tabella 4). Fa eccezione il cluster 5 che comprende 17 genomi di ceppi isolati tutti nel 2018 in regioni del nord, centro e sud d'Italia. La stessa analisi estesa ai dati relativi agli isolati clinici del 2019 ha consentito di osservare che 18 dei cluster identificati nel 2018 includevano anche isolati relativi al 2019 (Tabelle 4 e 5). Sette di questi (cluster 1, 2, 4, 5, 6, 28 e 80) comprendevano dagli 11 ai 28 genomi di ceppi isolati in diverse regioni in un arco temporale fino a 8 anni (Tabella 5).

Di seguito, nelle tabelle 4 e 5 vengono riportati i dettagli analitici di tutti i cluster presenti nel database IRIDA-ARIES (2010 – 2019) identificati analizzando i dati relativi agli isolati raccolti negli anni 2018 e 2019, rispettivamente.

Nelle Figure 5 e 6 vengono riportati i dendrogrammi, ottenuti mediante analisi di cgMLST dei genomi degli isolati clinici di *L. monocytogenes* relativi agli anni 2018 e 2019.

Tabella 4. Cluster identificati dalla piattaforma IRIDA-ARIES nel 2018 e confronto con anni precedenti

Cluster	Numero di casi	Sequence type	Sierogruppo	Regioni nel cluster 2018	Numeri di casi nel cluster (2010–2018)	Regioni coinvolte nel cluster con inclusi isolati di anni precedenti
Cluster_1	9	ST8	1/2a,3a	Emilia-Romagna, Friuli-Venezia Giulia, Lazio, Lombardia, Piemonte, Toscana, Umbria	11	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Emilia-Romagna, Friuli-Venezia Giulia, Lazio, Lombardia, Piemonte, Toscana, Umbria relativi agli anni 2014, 2017, 2018
Cluster_2	4	ST1	4b,4d,4e	Campania, Friuli-Venezia Giulia, Lazio	6	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Campania, Emilia-Romagna, Friuli-Venezia Giulia, Lazio, Lombardia relativi agli anni 2013, 2017, 2018
Cluster_3	4	ST1	4b,4d,4e	Lombardia, Piemonte	11	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lombardia, Piemonte relativi agli anni 2017, 2018
Cluster_4	4	ST5	1/2b,3b,7	Lazio	7	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lazio, Lombardia relativi agli anni 2013, 2015, 2018
Cluster_5	17	ST6	4b,4d,4e	Calabria, Campania, Friuli-Venezia Giulia, Lazio, Lombardia, Piemonte, Toscana, Umbria	17	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Calabria, Campania, Friuli-Venezia Giulia, Lazio, Lombardia, Piemonte, Toscana, Umbria relativi all'anno 2018
Cluster_6	1	ST155	1/2a,3a	Lombardia	17	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Campania, Emilia-Romagna, Lombardia relativi agli anni 2011, 2012, 2013, 2014, 2016, 2017, 2018
Cluster_8	3	ST288	1/2b,3b,7	Piemonte, Trentino-Alto Adige	5	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Piemonte, Trentino-Alto Adige relativi agli anni 2017, 2018
Cluster_9	3	ST6	4b,4d,4e	Piemonte	4	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Piemonte, Trentino-Alto Adige relativi agli anni 2017, 2018
Cluster_11	1	ST7	1/2a,3a	Marche	30	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Emilia-Romagna, Lombardia, Marche, Umbria relativi agli anni 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2018
Cluster_17	1	ST1	4b,4d,4e	Trentino-Alto Adige	4	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Marche, Piemonte, Trentino-Alto Adige relativi agli anni 2015, 2018

Cluster_28	5	ST325	1/2a,3a	Lombardia, Piemonte, Veneto	8	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lombardia, Piemonte, Veneto relativi agli anni 2011, 2013, 2017, 2018
Cluster_29	1	ST206	1/2a,3a	Marche	2	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Marche, Piemonte relativi agli anni 2017, 2018
Cluster_32	1	ST2	4b,4d,4e	Marche	3	Nel Database sono presenti isolati della regione Marche relativi agli anni 2016, 2018
Cluster_37	3	ST8	1/2a,3a	Lombardia, Umbria	3	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lombardia, Umbria relativi all'anno 2018
Cluster_38	2	ST38	1/2a,3a	Lombardia	7	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Emilia-Romagna, Lombardia, Piemonte, Trentino-Alto Adige relativi agli anni 2013, 2014, 2015, 2018
Cluster_39	2	ST3	1/2b,3b,7	Toscana	2	Nel Database sono presenti isolati della regione Toscana relativi all'anno2018
Cluster_53	2	ST155	1/2a,3a	Lombardia	2	Nel Database sono presenti isolati della regione Lombardia relativi agli anni 2017, 2018
Cluster_56	2	ST2	4b,4d,4e	Lombardia, Toscana	4	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lombardia, Toscana relativi agli anni 2017, 2018
Cluster_58	1	ST6	4b,4d,4e	Lombardia	2	Nel Database sono presenti isolati della regione Lombardia relativi agli anni 2013, 2018
Cluster_80	6	ST224	1/2b,3b,7	Lombardia	8	Nel Database sono presenti isolati della regione Lombardia relativi agli anni 2017, 2018
Cluster_85	2	ST217	4b,4d,4e	Lombardia	2	Nel Database sono presenti isolati della regione Lombardia relativi agli anni 2018
Cluster_100	4	ST1	4b,4d,4e	Lombardia, Toscana, Umbria	4	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lombardia, Toscana, Umbria relativi all'anno 2018
Cluster_101	2	ST101	1/2a,3a	Lazio, Lombardia	2	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lazio, Lombardia relativi all'anno 2018
Cluster_102	2	ST1	4b,4d,4e	Lombardia, Marche	2	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lombardia, Marche relativi all'anno2018
Cluster_103	2	ST394	1/2a,3a	Toscana	2	Nel Database sono presenti isolati della regione Toscana relativi all'anno 2018

Tabella 5. Cluster identificati dalla piattaforma IRIDA-ARIES nel 2019 e confronto con anni precedenti

Cluster	Numero di casi	Sequence type	Sierogruppo	Regioni nel cluster 2019	Numeri di casi nel cluster (2010-2019)	Regioni coinvolte nel cluster con inclusi isolati di anni precedenti
Cluster_1	16	ST8	1/2a,3a	Calabria, Emilia-Romagna, Lazio, Lombardia, Piemonte, Umbria, Veneto	27	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Calabria, Emilia-Romagna, Friuli-Venezia Giulia, Lazio, Lombardia, Piemonte, Toscana, Umbria, Veneto relativi agli anni 2014, 2017, 2018, 2019
Cluster_2	5	ST1	4b,4d,4e	Lazio, Toscana	11	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Campania, Emilia-Romagna, Friuli-Venezia Giulia, Lazio, Lombardia, Toscana relativi agli anni 2013, 2017, 2018, 2019
Cluster_4	21	ST5	1/2b,3b,7	Lazio, Lombardia, Marche	28	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lazio, Lombardia, Marche relativi agli anni 2013, 2015, 2018, 2019
Cluster_5	3	ST6	4b,4d,4e	Campania, Piemonte	20	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Calabria, Campania, Friuli-Venezia Giulia, Lazio, Lombardia, Piemonte, Toscana, Umbria relativi agli anni 2017, 2018, 2019
Cluster_6	4	ST155	1/2a,3a	Emilia-Romagna, Toscana, Veneto	21	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Campania, Emilia-Romagna, Lombardia, Toscana, Veneto relativi agli anni 2011, 2012, 2013, 2014, 2016, 2017, 2018, 2019
Cluster_8	4	ST288	1/2b,3b,7	Lombardia, Piemonte	9	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lombardia, Piemonte, Trentino-Alto Adige relativi agli anni 2017, 2018, 2019
Cluster_9	2	ST6	4b,4d,4e	Lombardia	6	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lombardia, Piemonte, Trentino-Alto Adige relativi agli anni 2017, 2018, 2019
Cluster_13	2	ST1	4b,4d,4e	Emilia-Romagna, Marche	4	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Emilia-Romagna, Marche relativi agli anni 2012, 2014, 2019
Cluster_17	1	ST1	4b,4d,4e	Emilia-Romagna	5	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Emilia-Romagna, Marche, Piemonte, Trentino-Alto Adige relativi agli anni 2015, 2018, 2019
Cluster_28	5	ST325	1/2a,3a	Lombardia, Piemonte	13	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lombardia, Piemonte, Veneto relativi agli anni 2011, 2013, 2017, 2018, 2019
Cluster_32	2	ST2	4b,4d,4e	Campania, Lazio	5	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Campania, Lazio, Marche relativi agli anni 2016, 2018, 2019
Cluster_36	2	ST1247	1/2a,3a	Emilia-Romagna, Lazio	2	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Emilia-Romagna, Lazio relativi all'anno 2019

Cluster_37	1	ST8	1/2a,3a	Lazio	4	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lazio, Lombardia, Umbria relativi agli anni 2018, 2019
Cluster_39	3	ST3	1/2b,3b,7	Toscana, Umbria	5	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Toscana, Umbria relativi agli anni 2018, 2019
Cluster_40	2	ST9	1/2c,3c	Lazio, Lombardia	2	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lazio, Lombardia relativi all'anno 2019
Cluster_44	1	ST398	1/2a,3a	Lazio	2	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lazio, Piemonte relativi agli anni 2018, 2019
Cluster_52	3	ST1	4b,4d,4e	Toscana	3	Nel Database sono presenti isolati della regione Toscana relativi all'anno 2019
Cluster_53	4	ST155	1/2a,3a	Lazio, Lombardia, Toscana, Umbria	6	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lazio, Lombardia, Toscana, Umbria relativi agli anni 2018, 2019
Cluster_56	2	ST2	4b,4d,4e	Lombardia, Piemonte	6	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lombardia, Piemonte, Toscana relativi agli anni 2017, 2018, 2019
Cluster_57	3	ST29	1/2a,3a	Lombardia, Piemonte	4	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lombardia, Piemonte relativi agli anni 2011, 2019
Cluster_58	2	ST6	4b,4d,4e	Abruzzo, Toscana	4	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Abruzzo, Lombardia, Toscana relativi agli anni 2013, 2018, 2019
Cluster_63	1	ST1	4b,4d,4e	Piemonte	2	Nel Database sono presenti isolati della regione Piemonte relativi agli anni 2018, 2019
Cluster_69	1	ST121	1/2a,3a	Piemonte	2	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Piemonte, Trentino-Alto Adige relativi agli anni 2015, 2019
Cluster_75	1	ST155	1/2a,3a	Lombardia	3	Nel Database sono presenti isolati della regione Lombardia relativi agli anni 2014, 2017, 2019
Cluster_76	6	ST1	4b,4d,4e	Lazio, Liguria, Lombardia, Marche, Piemonte	7	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lazio, Liguria, Lombardia, Marche, Piemonte, Trentino-Alto Adige relativi agli anni 2015, 2019
Cluster_78	2	ST3	1/2b,3b,7	Lazio, Lombardia	2	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lazio, Lombardia relativi all'anno 2019
Cluster_79	2	ST87	1/2b,3b,7	Lazio, Lombardia	2	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lazio, Lombardia relativi all'anno 2019
Cluster_80	3	ST224	1/2b,3b,7	Lombardia	11	Nel Database sono presenti isolati della regione Lombardia relativi agli anni 2017, 2018, 2019
Cluster_81	6	ST451	1/2a,3a	Lombardia, Piemonte, Toscana	6	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lombardia, Piemonte, Toscana relativi all'anno 2019

Cluster_83	2	ST808	1/2b,3b,7	Friuli-Venezia Giulia, Piemonte	2	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Friuli-Venezia Giulia, Piemonte relativi all'anno 2019
Cluster_84	5	ST155	1/2a,3a	Lombardia, Piemonte, Toscana	6	Nel Database sono presenti isolati delle regioni Lombardia, Piemonte, Toscana, Trentino-Alto Adige relativi agli anni 2015, 2019

È importante sottolineare che la notifica di un cluster di isolati avviene automaticamente al momento della sottomissione dei dati e successivamente all'analisi automatica degli stessi. La piattaforma di raccolta dati IRIDA-ARIES, infatti, notifica a fine analisi l'identificazione di un cluster di isolati a tutti gli utenti delle regioni coinvolte e al Ministero della Salute così che possano essere avviate tempestivamente le indagini epidemiologiche finalizzate alla eventuale conferma dell'esistenza di un cluster di casi e alla pronta risoluzione degli eventi.

Figura 5. cgMLST analisi dei genomi degli isolati clinici di *L. monocytogenes* nel 2018

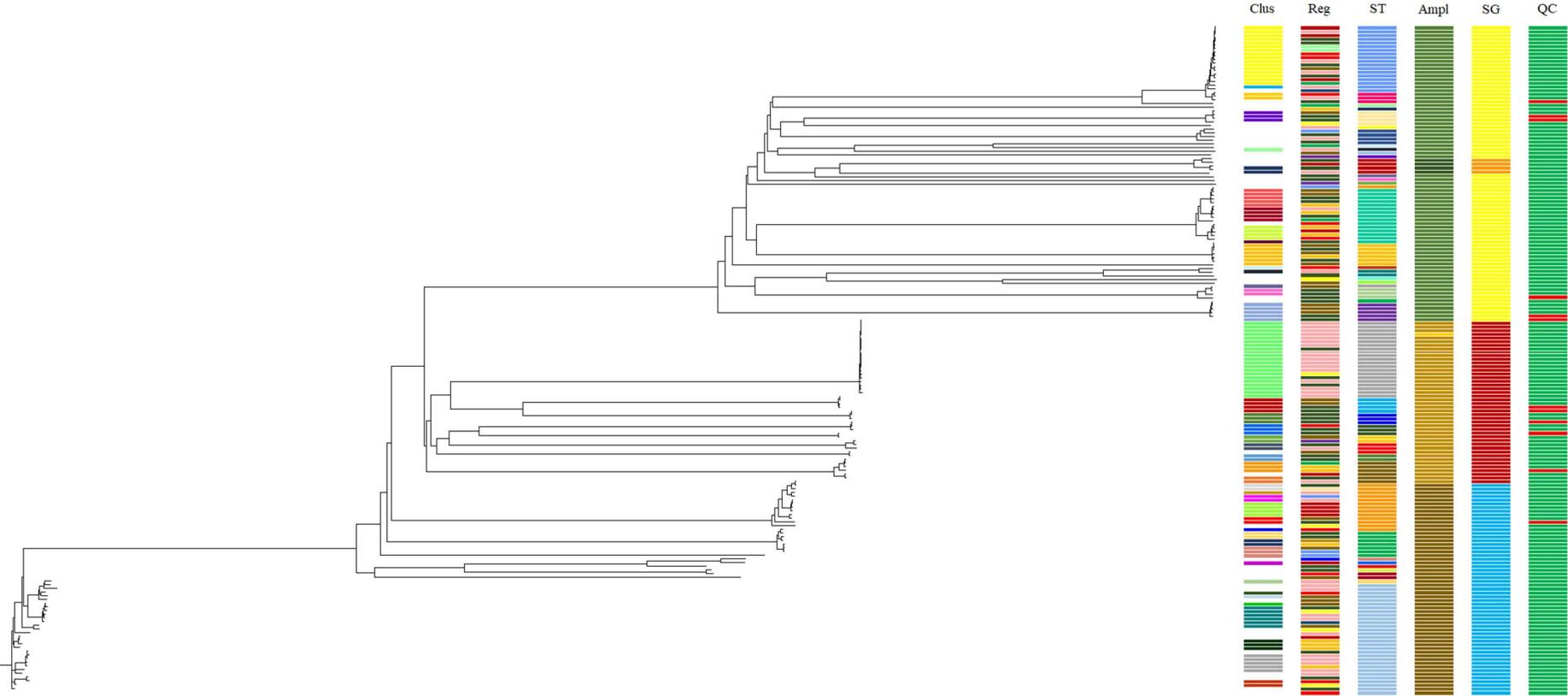
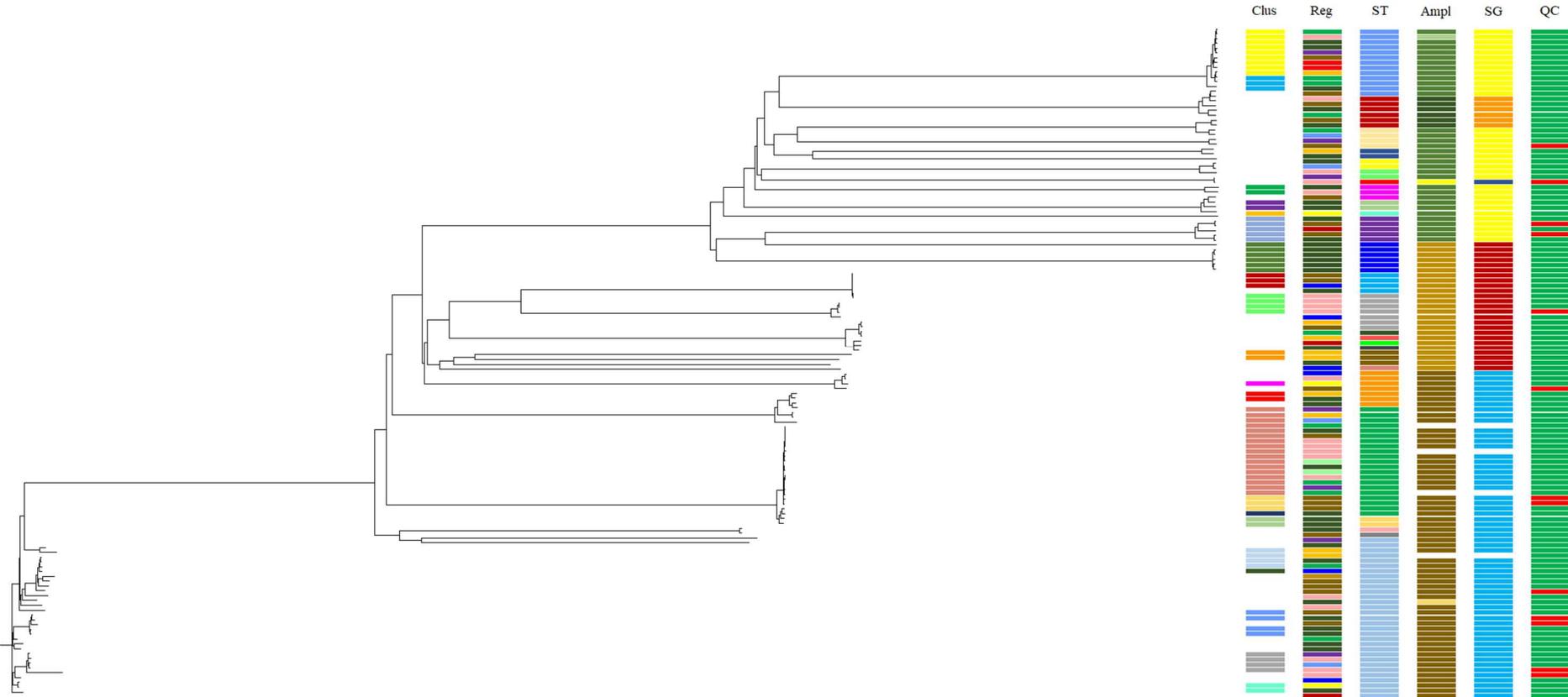


Figura 6. cgMLST analisi dei genomi degli isolati clinici di *L. monocytogenes* isolati nel 2019



Legenda dei colori utilizzati nei dendrogrammi

Cluster_Id		Regione	MLST_ST		Amplicons	Serogroup	QC_status
Cluster_1	Cluster_63	Abruzzo	ST0	ST91	Imo0737	1/2a,3a	Passed
Cluster_2	Cluster_69	Basilicata	ST1	ST101	Imo0737,Prs	1/2c,3c	Failed
Cluster_3	Cluster_75	Calabria	ST2	ST121	Imo1118,Imo0737,Prs	1/2b,3b,7	
Cluster_4	Cluster_76	Campania	ST3	ST155	ORF110	4b,4d,4e	
Cluster_5	Cluster_78	Emilia-Romagna	ST4	ST191	ORF2819	?4a,4c	
Cluster_6	Cluster_79	Friuli-Venezia Giulia	ST5	ST206	ORF2819,Prs		
Cluster_8	Cluster_80	Lazio	ST6	ST217	ORF2819,ORF2110,Prs		
Cluster_9	Cluster_81	Liguria	ST7	ST219	Prs		
Cluster_13	Cluster_83	Lombardia	ST8	ST224			
Cluster_17	Cluster_84	Marche	ST9	ST288			
Cluster_28	Cluster_85	Molise	ST11	ST325			
Cluster_29	Cluster_86	Piemonte	ST14	ST388			
Cluster_32	Cluster_87	Puglia	ST16	ST391			
Cluster_36	Cluster_88	Sardegna	ST18	ST397			
Cluster_37	Cluster_89	Sicilia	ST19	ST398			
Cluster_38	Cluster_90	Toscana	ST20	ST403			
Cluster_39	Cluster_93	Trentino-Alto Adige	ST21	ST412			
Cluster_40	Cluster_95	Umbria	ST26	ST451			
Cluster_44	Cluster_96	Valle d'Aosta	ST29	ST489			
Cluster_52	Cluster_97	Veneto	ST32	ST504			
Cluster_53	Cluster_98		ST37	ST576			
Cluster_56	Cluster_100		ST38	ST663			
Cluster_57	Cluster_101		ST59	ST736			
Cluster_58	Cluster_102		ST77	ST808			
			ST87	ST1247			

Conclusioni

Nel 2019 è stato aperto all'utenza regionale il sistema nazionale della raccolta dei dati di sequenziamento genomico degli isolati clinici di *L. monocytogenes* da casi di listeriosi nell'uomo. In questo primo periodo di attività sono stati fatti sforzi per il consolidamento della rete di sorveglianza, del servizio di sequenziamento offerto dall'ISS alle regioni che non avessero questa disponibilità analitica sul territorio e nel contempo è stata fatta formazione per permettere un utilizzo remoto della piattaforma IRIDA-ARIES che comprendesse sia la sottomissione che l'analisi dei dati raccolti.

Dall'analisi dei dati relativi agli isolati clinici del 2018 e del 2019 inviati in ISS o sequenziati sul territorio è emerso un quadro molto netto relativamente alla circolazione dei diversi sierogruppi e "sequence types" di *L. monocytogenes* sul territorio nazionale e in modo particolare, è stato possibile identificare diversi clusters genomici, in alcuni casi con una dimensione sovraregionale, che sono stati prontamente comunicati ai presidi territoriali identificati dalle autorità competenti locali. Quest'ultimo aspetto riveste una particolare rilevanza consentendo una pronta e completa diffusione delle informazioni relative a possibili clusters di casi di infezione nell'uomo a tutti gli attori che devono essere coinvolti nelle indagini. La piattaforma IRIDA-ARIES opera al momento in una fase pilota al fine di conseguire i) un allineamento con la letteratura scientifica in termini di soglie per l'identificazione di clusters genomici e parametri dell'analisi bioinformatica ii) il consolidamento della rete di sorveglianza attraverso il contatto tra gli utenti in caso di clusters, iii) una migliore e sempre più completa esperienza d'uso con lo scopo di fornire alle Autorità Competenti uno strumento operativo per la pronta ed efficace azione di contrasto sul territorio di possibili focolai di infezione da *L. monocytogenes*. Per questo scopo, i moderatori della piattaforma IRIDA-ARIES in ISS, operano costantemente al miglioramento delle prestazioni della piattaforma anche sulla base del ritorno di informazione all'utenza fornito attraverso la casella postale listeriosi@iss.it.

Attualmente, presso l'ISS, viene eseguito il sequenziamento genomico degli isolati clinici ricevuti nella routine in ottemperanza alla nota circolare "Sorveglianza e prevenzione della Listeriosi" (0008252-13/03/2017-DGPRE-DGPRE-P) e il sequenziamento genomico degli isolati clinici d'archivio raccolti nella collezione ISS al fine di pervenire ad una analisi storica della distribuzione geografica e temporale degli isolati clinici di *L. monocytogenes* sul territorio nazionale e comprenderne le dinamiche di circolazione nella popolazione. Una prima valutazione dell'andamento del servizio di analisi genomica degli isolati clinici di *L. monocytogenes* presso l'ISS induce alle seguenti considerazioni:

- 1) La produzione e raccolta delle informazioni di sequenziamento genomico presso l'ISS e l'offerta di strumenti analitici completamente automatizzati (piattaforma IRIDA-ARIES) rappresenta una importante risorsa per il territorio nazionale che ha

accesso ad un livello analitico avanzato senza dover necessariamente investire in acquisizione e/o formazione di risorse in ambito specifico;

- 2) L'analisi dell'informazione genomica consente di seguire le dinamiche della circolazione dei ceppi di *L. monocytogenes* sul territorio nazionale sia in tempo reale, consentendo la pronta identificazione di possibili focolai, sia retrospettivamente permettendo di identificare focolai persistenti e la relativa dimensione territoriale. Questo consente di mettere in campo misure per mitigare l'impatto di focolai identificati precocemente e di comprendere i meccanismi che permettono la persistenza di ceppi di *L. monocytogenes*. Inoltre, la raccolta dei dati di genomica a livello nazionale consente di rispondere alle allerte nazionali ed internazionali sulla identificazione di cluster attraverso la comparazione del profilo genomico degli isolati e la valutazione della presenza di isolati con profilo compatibile;
- 3) la valutazione dei dati di qualità delle sequenze ha mostrato un miglioramento di questo parametro nel 2019 rispetto ai dati del 2018. Questo può in parte essere attribuito alla sostituzione della piattaforma di sequenziamento in ISS con un modello di nuova generazione e alla definizione di parametri di corsa più stringenti;
- 4) l'incorporazione di moduli per analisi che possono essere lanciate direttamente dall'utenza più esperta rappresenta un'area di gradimento per quest'ultima tipologia di utenti ed è in corso di ampliamento;
- 5) è fondamentale estendere la copertura territoriale della raccolta dati attraverso l'invio degli isolati clinici in ISS o il loro sequenziamento utilizzando risorse disponibili sul territorio. In particolare, quest'ultimo aspetto consentirebbe di definire con più precisione lo spettro dei ceppi di *L. monocytogenes* circolanti sul territorio e di ridurre sensibilmente i tempi che intercorrono tra l'isolamento del ceppo dal caso di malattia e la possibile identificazione di clusters con la conseguente riduzione dei tempi dell'azione di contrasto da parte delle Autorità sanitarie.

Ad oggi gli isolati clinici di *L. monocytogenes* inclusi nella piattaforma IRIDA – ARIES provengono da 15 regioni.