

Caratterizzazione di ceppi *Listeria monocytogenes* isolati da formaggi a pasta molle e semi-molle prelevati nella regione Abruzzo

Vicdalia A. Acciari, Marina Torresi, Giacomo Migliorati, Elisabetta Di Giannatale, Primula Semprini[†] & Vincenza Prencipe

Riassunto

Sono stati caratterizzati 47 ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati in un'indagine condotta su formaggi prelevati al dettaglio. Cinque formaggi (gorgonzola, taleggio, asiago, crescenza e brie) sono stati selezionati tra quelli a pasta semi molle e molle di maggior consumo su scala nazionale e più frequentemente contaminati da *Listeria monocytogenes*. Per ogni ceppo è stato determinato il sierotipo, il pattern di resistenza agli antibiotici e il profilo di macrorestrizione con la Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). I principali sierotipi rilevati sono risultati l'1/2a (76,6%) e l'1/2c (21,3%) mentre il sierotipo 1/2b è stato rilevato solo in 1 campione. Il 97,9% dei ceppi è risultato resistente all'oxicillina, l'80,9% alla lincomicina e il 78,7% alla clindamicina. La resistenza a 2 antibiotici è stata rilevata nel 17% dei ceppi con due diversi pattern (OXCC, OXL) mentre a 3 nel 70,2% con un unico profilo (OXCL). Non sono stati rilevati ceppi sensibili a tutte le molecole testate. Con l'analisi combinata dei profili di macrorestizione di *Ascl* e *Apal*, sono stati identificati 11 pulsotipi suddivisi in 3 cluster. Due pulsotipi sono risultati prevalenti raggruppando rispettivamente il 57,4% e il 21,3% dei ceppi isolati. L'analisi dei profili PFGE non ha rilevato relazioni tra pulsotipo e tipo di formaggio, ditta produttrice o punto vendita. La valutazione della distribuzione temporale dei pulsotipi ha messo in evidenza la presenza

di un profilo persistente durante tutto il periodo di studio, ad eccezione dei mesi di agosto e settembre in cui è stato rilevato un pulsotipo diverso. Pertanto l'indagine ha permesso di rilevare la variabilità nel tempo della prevalenza di alcuni specifici pulsotipi che ha fatto ipotizzare l'intervento di fattori che hanno influenzato le dinamiche di contaminazione di questi prodotti. Studi su larga scala potrebbero contribuire al chiarimento di tale fenomeno.

Parole chiave

Antibiotico-resistenza, Formaggi, Italia, *Listeria monocytogenes*, PFGE, Sierotipo.

Introduzione

La *Listeria monocytogenes* rappresenta oggi la quinta causa di zoonosi e negli ultimi anni nell'Unione Europea si sta registrando un incremento dei casi di listeriosi nell'uomo (13). Essendo un microrganismo ubiquitario, in grado di adattarsi a condizioni ambientali molto varie, la contaminazione da *Listeria monocytogenes* nell'ambito del processo di produzione rappresenta un grave rischio per i prodotti pronti per il consumo che includono, tra gli altri, i formaggi. Negli anni 1999-2001, circa metà dei focolai e dei casi sporadici di listeriosi nell'uomo sono stati associati al consumo di formaggi. Nel 2006 nella Repubblica Ceca e nel 2007 in Norvegia sono

Reparto di Igiene delle Tecnologie alimentari e dell'alimentazione animale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo & del Molise 'G. Caporale' Via Campo Boario, 64100 Teramo, Italia
a.acciari@izs.it, v.prencipe@izs.it

stati registrati due focolai associati al consumo di formaggi che hanno causato rispettivamente 78 ospedalizzazioni con 13 decessi (13) e 21 casi di ospedalizzazione con 5 decessi (14). Secondo i risultati del "Progetto pilota di sorveglianza per *Listeria monocytogenes*" effettuato dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" (Istituto G. Caporale) nel 2007, *Listeria monocytogenes* è stata isolata nel 4,5% dei campioni di gorgonzola e nel 5,9% di taleggio (23), rispetto all'1,4% riportato per altri formaggi italiani dall'EFSA (12) e con elevati livelli di contaminazione (fino a 460 MPN/g nel taleggio) superiori al criterio di sicurezza fissato dal Regolamento (CE) n. 2073/2005 (8).

L'origine della presenza di *Listeria monocytogenes* in questo alimento è principalmente ambientale e i meccanismi con cui si diffondono sono specifici per ogni stabilimento (19, 26). La predominanza e la persistenza di specifici subtipi di *Listeria monocytogenes* hanno permesso di ipotizzare l'esistenza di ceppi caratterizzati da una particolare abilità a colonizzare gli ambienti di lavorazione e a sopravvivere a stress ambientali (2, 26). Rimane ancora difficile individuare, negli stabilimenti di produzione, le fonti di contaminazione e il loro contributo nella contaminazione del prodotto finito, così come stabilire la connessione tra gli alimenti contaminati e i casi sporadici di infezione da *Listeria monocytogenes* (11). Metodi di tipizzazione fenotipici quali la sierotipizzazione hanno un basso potere discriminante e risultano spesso lunghi e laboriosi. Ciò richiede l'applicazione costante di tecniche di tipizzazione molecolare che permettano di correlare i ceppi isolati e stabilire nessi con particolari tipologie di matrici al fine di valutare la capacità di adattamento di *Listeria monocytogenes* a specifiche nicchie. Sebbene siano stati sviluppati diversi metodi di caratterizzazione, il metodo "gold standard" rimane quello della Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) grazie alla sua elevata riproducibilità, robustezza e alto potere discriminante (22, 25) dimostrandosi un valido e rapido strumento nella sorveglianza di focolai e di casi sporadici di listeriosi (4, 15, 16, 25).

Gli studi sinora pubblicati sulla caratterizzazione di ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da formaggi descrivono i pulsotipi rilevati in relazione al singolo tipo di prodotto esaminato (10, 19, 22) ma non hanno preso in considerazione eventuali associazioni tra ceppi isolati da diversi tipi di formaggio. Questo studio si propone di caratterizzare mediante sierotipizzazione, valutazione dei profili di resistenza agli antibiotici e PFGE, ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati dai 5 principali tipi di formaggi a pasta molle e semi molle tra i più consumati in Italia, prelevati al dettaglio in esercizi commerciali abruzzesi, al fine di valutarne la distribuzione e determinare la presenza di possibili associazioni tra i ceppi isolati e il tipo di prodotto, i punti vendita e il periodo di prelievo.

Materiali e metodi

Campioni

Sono stati analizzati 47 ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati in formaggi a pasta molle e semi molle prelevati in 39 punti vendita abruzzesi nel periodo marzo 2005-ottobre 2006 nell'ambito del "Progetto pilota di sorveglianza per *Listeria monocytogenes*" effettuato dall'Istituto G. Caporale. In particolare sono stati esaminati 21 ceppi isolati da formaggio Gorgonzola, 21 da Taleggio, 3 da Brie, 1 da Crescenza e 1 da Asiago.

I ceppi sono stati sottoposti a tipizzazione sierologica, analisi di resistenza agli antimicrobici e PFGE.

Sierotipizzazione

I ceppi sono stati sottoposti a tipizzazione sierologica secondo il metodo del US/FDA *Bacteriological Analytical Manual* (3) utilizzando sieri commerciali per gli antigeni somatici "O" e flagellari "H" (Denkan Seikem Co. Ltd, Tokio).

Analisi di resistenza agli antimicrobici

La valutazione della sensibilità agli antimicrobici è stata effettuata mediante il test di diffusione su Mueller Hinton agar secondo Kirby-Bauer (20), utilizzando il set di antimicrobici riportato in Tabella I.

I risultati sono stati interpretati secondo i criteri del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (6, 7). I ceppi, pertanto sono stati caratterizzati con il proprio profilo di resistenza rappresentato dalla sigla delle molecole per le quali hanno manifestato resistenza.

PFGE

I ceppi di *Listeria monocytogenes* sono stati caratterizzati mediante PFGE secondo il protocollo adottato dal network PulseNet (5) che prevede gli enzimi di restrizione *Ascl* e *Apal* e il ceppo *Salmonella* sierotipo *Braenderup* (H9812) come standard. Le sospensioni batteriche sono state incluse in agarosio, lisate, lavate e digerite con gli enzimi di restrizione. I campioni digeriti sono stati sottoposti ad elettroforesi in agarosio Seakem Gold 1% (BIOSPA, Milano) nel sistema Chef Mapper XA (BioRad Inc, CA, USA) a 6V/cm con un tempo di pulso da 4 s a 40 s per 22 ore.

Analisi dei profili PFGE

I profili di PFGE dei ceppi isolati sono stati analizzati con il software BioNumerics versione 4.0 (Applied Maths, Kortrijk). Le similarità tra i profili di macrorestrizione (MRP) sono state calcolate usando il

coefficiente di Dice (17) considerando l'ottimizzazione e la tolleranza all'1,2% per entrambi gli enzimi. Successivamente, il software ha effettuato la clusterizzazione e la costruzione dei dendrogrammi, con il metodo UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*). L'attendibilità della clusterizzazione è stata stimata calcolando il coefficiente di correlazione cofenetica per ciascun dendrogramma.

Risultati

Sierotipi

Tutti i 47 ceppi sono risultati tipizzabili e i sierotipi rilevati sono stati:

- 1/2a (76,6%)
- 1/2c (21,3%)
- 1/2b (2,1%).

Al sierotipo 1/2a appartengono il 76,2% dei ceppi isolati da Gorgonzola, l'85,7% di quelli isolati da Taleggio e 2 ceppi isolati da Brie. Il 23,8% dei ceppi isolati da Gorgonzola, il 14,3% di quelli isolati da Taleggio e i 2 ceppi isolati da Asiago e Crescenza sono stati identificati come sierotipo 1/2c. L'unico ceppo sierotipo 1/2b è stato riscontrato in un formaggio Brie (Tabella II).

Tabella I

Set di antimicrobici utilizzati per il test di diffusione su Muller Hinton agar secondo Kirby Bauer
Valori di cut-off e range di concentrazione suggeriti dal *Clinical and Laboratory Standards Institute*

Antimicrobico	Sigla molecola	Valore di cut-off (mm) R≤	Range di concentrazione testato (μg)
Ampicilina	AM	19*	10
Cefalotina	KF	14	30
Clindamicina	CC	14	2
Cloramfenicolo	C	12	30
Enrofloxacin	ENO	16	5
Eritromicina	E	13	15
Gentamicina	GM	12	10
Lincomicina	L	9	2
Oxicillina	OX	10	1
Penicillina	P	19*	10 unit
Streptomicina	S	11*	10
Tetraciclina	TE	14	30
Trimethoprim + sulfamethoxazolo	SXT	10	1.25/23.75
Vancomicina	VA	9	30

* valori indicati dalla ditta Becton Dickinson, approvati dal FDA

Analisi di resistenza agli antimicrobici

Nei 47 ceppi analizzati, sono stati individuati cinque differenti profili di resistenza: il più rappresentato è risultato OXCCL, seguito da OX, OXCC, OXL e L (Tabella II). Il 97,9% dei ceppi è risultato resistente all'OX, l'80,9% alla L e il 78,7% alla CC. Non sono state osservate resistenze per AM, KF, GM, E, ENO, SXT, VA, C, P, S, TE.

La resistenza a 2 antimicrobici è stata rilevata nel 17% dei ceppi con due pattern diversi (OXCC, OXL) mentre a 3 nel 70,2% con un unico profilo (OXCCL) il quale è presente in tutte le cinque tipologie di formaggi. Per il 12,7% dei ceppi si è osservata la resistenza ad un singolo antimicrobico (OX, L). Non sono stati rilevati ceppi sensibili a tutte le molecole testate. La distribuzione dei diversi pattern di resistenza in relazione al tipo di formaggio è riportato in Tabella II.

PFGE

Tutti i 47 ceppi sono risultati tipizzabili con *AscI* e *Apal*. Entrambi gli enzimi hanno mostrato, sui ceppi analizzati, lo stesso potere discriminante permettendo di ottenere 9 profili di macrorestrizione associati alla restrizione con *AscI* e 9 profili di macrorestrizione associati alla restrizione con *Apal*. L'analisi combinata dei due enzimi ha prodotto 11 differenti pulsotipi (denominati con lettere A-M) aventi una similarità del 66,7%

(Figura 1). In particolare i pulsotipi più frequentemente isolati sono risultati B (57,4%), I (21,3%) e A (4,3%). I restanti pulsotipi erano rappresentati da un singolo ceppo.

L'analisi del dendrogramma ha permesso, inoltre, la distinzione degli isolati in tre cluster principali: I (33 ceppi), II (2 ceppi) e III (10 ceppi) aventi una similarità del 72,9%. Due isolati (pulsotipi M ed L), con una similarità pari al 67 % e 66,7%, si sono localizzati ai margini dei due cluster. In particolare, il cluster I con similarità dell'85,5%, è risultato formato da 6 pulsotipi (A-F), tra cui i pulsotipi A e B aventi similarità 96,2% e C e D aventi similarità 96,7%. Il cluster III è rappresentato da un solo pulsotipo corrispondente al profilo I in cui si raccolgono 10 isolati aventi il 100% di similarità.

Distribuzione dei pulsotipi tra i diversi sierotipi

Dalla correlazione tra i risultati di PFGE e sierotipo si è osservato che il cluster I ha compreso il 91,7% dei ceppi aventi sierotipo 1/2a, il cluster II due isolati 1/2a e il cluster III tutti gli isolati 1/2c. I ceppi esclusi dai tre cluster sono risultati appartenenti ai sierotipi 1/2a e 1/2b.

Distribuzione dei pulsotipi tra le diverse matrici

La distribuzione dei diversi pulsotipi in relazione al tipo di formaggio è riportato in

Tabella II

Distribuzione dei sierotipi e profili di resistenza agli antimicrobici nelle diverse tipologie di formaggi

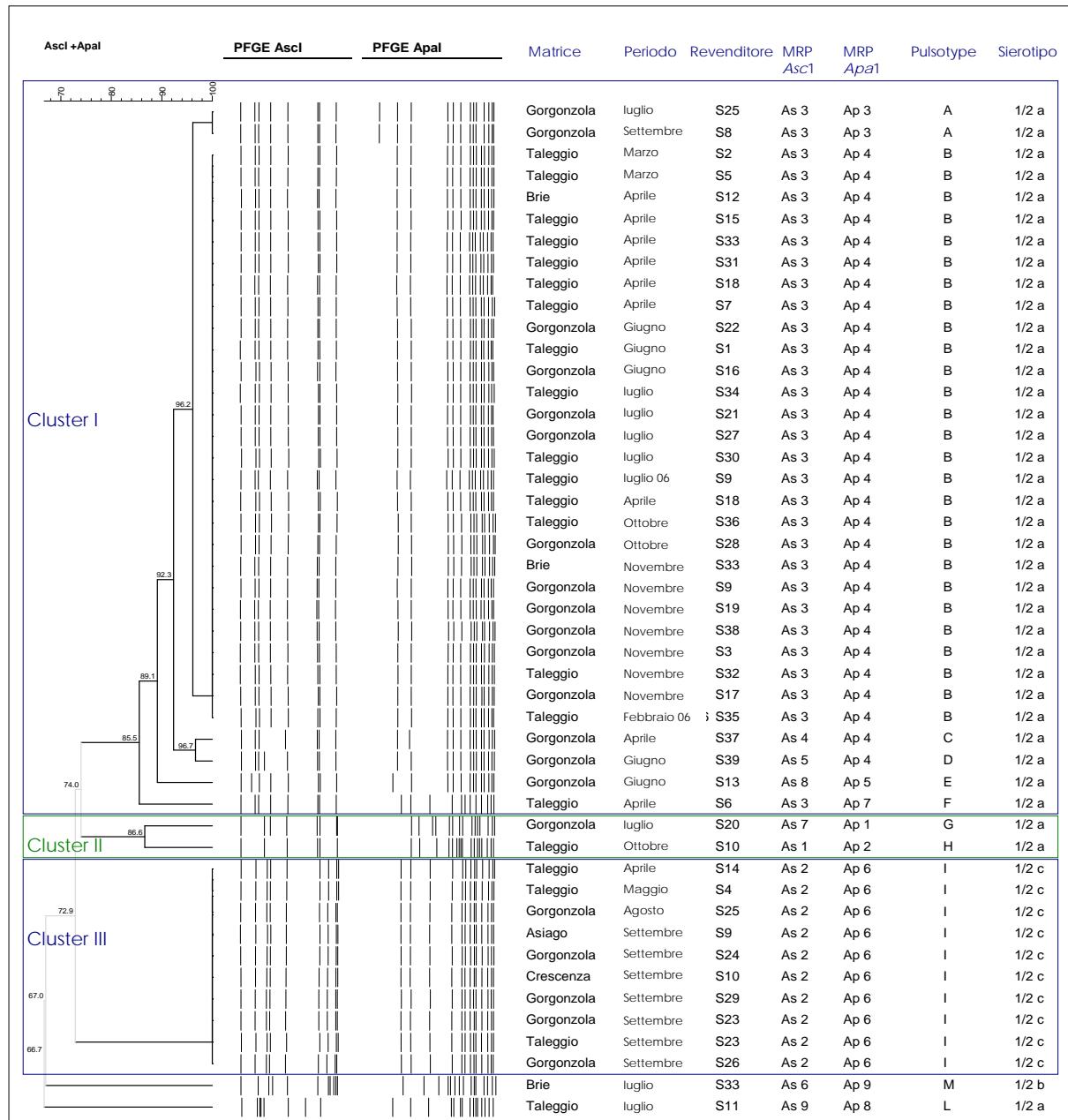
Tipo formaggio	Sierotipo (%)			Profili di resistenza (%)				
	1/2	1/2 b	1/2 c	L	OX	OX CC	OX CC L	OX L
Asiago (n = 1)	-	-	100	-	-	-	100	-
Brie (n = 3)	66,7	33,3	-	-	-	-	100	-
Crescenza (n = 1)	-	-	100	-	-	-	100	-
Gorgonzola (n = 21)	76,2	-	23,8	4,8	-	4,8	81	9,5
Taleggio (n = 21)	85,7	-	14,3	-	23,8	14,3	52,4	9,5
Totale complessivo	76,6	2,1	21,3	2,1	10,6	8,5	70,2	8,5

n numero di ceppi

L lincomicina

OX oxicillina

CC clindamicina



MRP profilo di macrorestrizione

Figura 1

Dendrogramma della matrice combinata dei profili di macrorestrizione di *Ascl* e *Apal*

Le similarità tra i profili di macrorestrizione sono state calcolate usando il coefficiente di Dice con parametro di ottimizzazione fissato all'1,2% e tolleranza 1,2% per entrambi gli enzimi

La clusterizzazione e la costruzione dei dendrogrammi, è stata effettuata con il metodo UPGMA

Il dendrogramma ha una correlazione cofenetica pari 98%

Tabella III. Il cluster I ha raggruppato ceppi isolati da Gorgonzola, Taleggio e Brie. In particolare, tali ceppi appartenevano ad un singolo pulsotipo (B). Il cluster II ha compreso ceppi isolati da Gorgonzola e Taleggio, mentre il cluster III ceppi isolati da Gorgonzola, Taleggio, Asiago e Crescenza.

Distribuzione temporale dei pulsotipi

Valutando i pulsotipi rispetto al periodo di studio è stata rilevata una particolare distribuzione rispetto a quattro specifici intervalli di tempo: marzo-aprile, giugno-luglio, agosto-settembre e ottobre-novembre. Dall'analisi dei profili genetici è emerso che nei

Tabella III

Distribuzione percentuale dei pulsotipi nelle diverse tipologie di formaggi

Pulsotipo	Cluster	Asiago (n = 1)	Brie (n = 3)	Crescenza n = 1)	Gorgonzola (n = 21)	Taleggio (n = 21)	Totale
A	I				9,5		4,3
B			66,7		47,6	71,4	57,4
C					4,8		2,1
D					4,8		2,1
E					4,8		2,1
F						4,8	2,1
G	II				4,8		2,1
H						4,8	2,1
I	III	100		100	23,8	14,3	21,3
L						4,8	2,1
M			33,3				2,1

periodi marzo-aprile, giugno-luglio e ottobre-novembre il cluster I ha rappresentato rispettivamente il 91,7%, il 76,9% e il 90% dei ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati. Nell'ambito del cluster I, il pulsotipo B è stato rilevato con maggior frequenza (75% in marzo-aprile, il 57,1% e il 90% nel periodo ottobre-novembre). Nel periodo agosto-settembre l'88,9% dei ceppi isolati era rappresentato dal cluster III (pulsotipo I) (Figura 2).

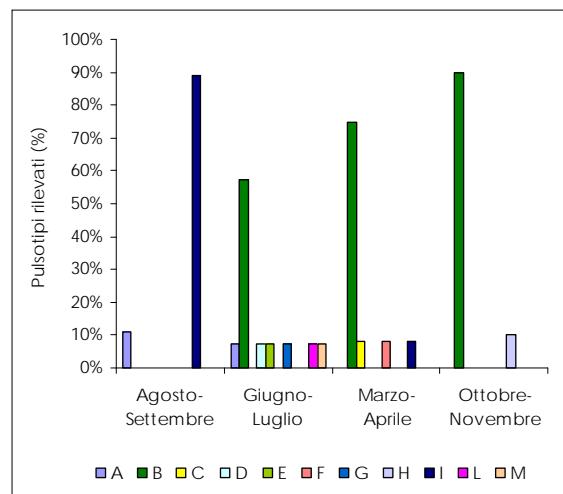


Figura 2
Distribuzione temporale dei diversi pulsotipi

Discussione

Questo studio si è proposto di rilevare possibili associazioni tra i ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da cinque tipi di formaggio a pasta

molle e semi molle prelevati al dettaglio con il tipo di prodotto, il punto vendita o con il periodo di prelievo. L'analisi dei ceppi ne ha previsto la caratterizzazione mediante sierotipizzazione, valutazione dei profili di resistenza agli antibiotici e PFGE.

Il sierotipo 1/2a, a cui appartenevano il 76,6% dei ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati, è risultato prevalere rispetto agli altri, come riportato in precedenti studi che hanno evidenziato una maggiore frequenza di questo sierotipo in ceppi isolati da formaggi e da casi di listeriosi associati al consumo di tale prodotto (16, 22). Alcuni autori hanno affermato che questo sierotipo potrebbe avere caratteristiche particolari che lo rendono più resistente alle condizioni imposte dai processi di trasformazione (24). Studi mirati a stabilire una correlazione tra sierotipo e fattori ambientali hanno messo in evidenza che la prevalenza del sierotipo 1/2a negli alimenti potrebbe essere riconducibile alla maggiore resistenza di questo sierotipo alle batteriocine (6). Diversamente da quanto rilevato da altri autori (16, 21, 22), il sierotipo 1/2b è stato isolato da un unico prelievo di formaggio Brie. Al contrario, il sierotipo 1/2c, la cui prevalenza nei formaggi è normalmente bassa rispetto ad altre matrici (1, 21), è stato identificato nel 21,3% dei ceppi analizzati.

I risultati ottenuti dalla risposta agli antimicrobici hanno confermato, in generale, la

suscettibilità agli antibiotici di scelta per il trattamento dei casi di listeriosi (penicillina, ampicillina, gentamicina e trimethoprim associato a sulfamethoxazolo) (9). I profili di resistenza sono risultati scarsamente diversificati in funzione dei differenti tipi di formaggio, non risultando quindi utili nella discriminazione dei ceppi isolati.

L'analisi dei ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati rispetto ai punti vendita dove i diversi tipi di formaggio sono stati acquistati, non ha evidenziato alcuna particolarità poiché i ceppi si sono distribuiti indistintamente tra i due pulsotipi prevalenti, il pulsotipo B (57,4%) e I (21,3%). Questo ha permesso di escludere che i ceppi isolati potessero derivare dalla contaminazione del campione con utensili o superfici utilizzati nei punti vendita con servizio al banco.

La presenza di ceppi con identici profili di macrorestizione isolati da diversi tipi di formaggi potrebbe indicare una loro ampia diffusione in natura e per questo più frequentemente reintrodotti negli impianti di trasformazione attraverso le materie prime (4). Tale evenienza potrebbe essere imputabile anche a particolari caratteristiche di questi ceppi come una maggior capacità di adesione alle superfici e/o resistenza ai disinfettanti che permetterebbero loro di sopravvivere negli ambienti di lavorazione determinandone la contaminazione per lunghi periodi interessando anche prodotti diversi preparati nell'ambito della stessa struttura produttiva.

Contrariamente è stata osservata una particolare distribuzione dei due pulsotipi prevalenti in alcuni dei mesi in cui il campionamento è stato svolto. In particolare l'80% (10) dei ceppi appartenenti al Cluster III (profilo I), seppure presenti in quattro differenti tipi di formaggio (Gorgonzola, Taleggio, Crescenza e Asiago) sono stati isolati esclusivamente nel periodo fine agosto-settembre mentre nel periodo precedente e successivo i ceppi isolati sono risultati appartenere al Cluster I. Ciò potrebbe lasciar ipotizzare l'intervento di un fattore che ha determinato l'insorgenza di un clone che per caratteristiche di resistenza o particolari condizioni ambientali può essere diventato

temporaneamente prevalente. Il profilo B, maggiormente rappresentato, poiché presente nel 57,4% dei ceppi analizzati, è stato riscontrato in diversi periodi dell'anno con una maggior frequenza nei mesi di marzo-aprile (33,3%), giugno-luglio (29,6%) e ottobre-novembre (33,3%). Alcuni autori hanno ricondotto l'isolamento di ceppi con identico profilo in diversi periodi dell'anno alla capacità di tale clone a persistere nell'ambiente e a contaminare diversi prodotti e/o materie prime (18). Altri studi hanno mostrato come il riscontro di ceppi con identici pulsotipi ma derivanti da contesti diversi (matrici, produttori e in diversi periodi dell'anno) potrebbero indicare l'esistenza di ceppi temporalmente e geograficamente aspecifici (4).

Conclusione

L'analisi complessiva dei ceppi isolati non ha permesso di evidenziare una correlazione tra sierotipi, pulsotipi, tipologia di matrice e punto vendita. Difatti i sierotipi e i pulsotipi prevalenti appaiono indistintamente distribuiti nei prodotti esaminati non evidenziando una particolare associazione con tipo di prodotto.

Inoltre l'analisi dei profili molecolari ha evidenziato una prevalenza di specifici pulsotipi lasciando ipotizzare la persistenza di cloni che, per caratteristiche di resistenza o particolari condizioni ambientali, possono essere diventati prevalenti.

E' necessario, per approfondire lo studio della capacità di *Listeria monocytogenes* di persistere nell'ambiente di lavorazione, eseguire ulteriori test. In particolare la valutazione dell'adattabilità e della cross-adattabilità ai prodotti sanificanti, il grado di adesività alle superfici e la produzione di biofilm potrebbero identificare caratteristiche in grado di aumentare la discriminazione tra i ceppi oggetto di studio.

Si rendono quindi necessari studi specifici su larga scala per identificare le fonti e la dinamica di contaminazione da *Listeria monocytogenes* nel processo di produzione dei formaggi a pasta molle e semi-molle che rappresentano le categorie di maggior

consumo e quelle risultate più frequentemente contaminate.

Individuare le fonti e il loro contributo nella contaminazione del prodotto finito, è prioritario per definire qualsiasi efficace misura di controllo.

Bibliografia

1. Aureli P., Ferrini A.M., Mannoni V., Hodzic S., Wedell-Weergaard C. & Oliva B. 2003. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. *Int J Food Microbiol*, **83**, 325-330.
2. Autio T., Lundén J., Fredriksson-Ahomaa M., Björkroth J., Sjöberg A.-M. & Korkeala H. 2002. Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. *Int J Food Microbiol*, **77**, 83-90.
3. Bennett R.W. & Weaver R.E. 2001. Serodiagnosis of *Listeria monocytogenes* (United States Food and Drug Administration Bacteriological analytical manual, 8th Ed., Revision A, 1998, Chapter 11 (www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071418.htm ultimo accesso 15 dicembre 2010).
4. Buncic S., Avery S.M., Rocourt J. & Dimitrijevic M. 2001. Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? *Int J Food Microbiol*, **65**, 201-212.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2004. PulseNet USA: Standardized protocol for molecular subtyping of *Listeria monocytogenes* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). CDC, Atlanta, 9 pp (www.cdc.gov/pulsenet/protocols/pulsenet_listeria_protocol%20.pdf ultimo accesso 15 dicembre 2010).
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (previously: National Committee for Clinical Laboratory Standards) 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, Approved Standard-Second Edition. CLSI, Wayne, Pennsylvania, Vol. 22, No. 6, M31-A2.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (previously: National Committee for Clinical Laboratory Standards) 2004. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fourteenth informational supplement. CLSI, Wayne, Pennsylvania, Vol. 24, No. 1, M100-S14.
8. Commissione delle Comunità Europee 2005. Regolamento (CE) n. 2073 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. *Gazz Uff*, **L 338**; 1-26 del 22/12/2005 (eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:it:pdf ultimo accesso 15 dicembre 2010).
9. Davis J.A. & Jackson C.R. 2009. Comparative antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, and *L. welshimeri*. *Microb Drug Resist*, **15** (1), 27-32.
10. De Cesare A., Manfreda G., Macrì M. & Cantoni C. 2007. Application of automated ribotyping to support the evaluation of *Listeria monocytogenes* sources in a Taleggio cheese producing plant. *J Food Prot*, **70** (5), 1116-1121.
11. European Food Safety Authority (EFSA) 2007. Request from the European Commission on request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness. Scientific Opinion of the panel on biological hazards (Question No. EFSA-Q-2007-064), adopted on 6 December 2007. *EFSA J*, **599**, 1-42 (www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/599.pdf ultimo accesso 15 dicembre 2010).
12. European Food Safety Authority (EFSA) 2007. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. EFSA, Parma, 288 pp (www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/zoonosesreport2005.pdf ultimo accesso 15 dicembre 2010).
13. European Food Safety Authority (EFSA) 2007. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. EFSA, Parma, 351 pp (www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/130r.pdf ultimo accesso 15 dicembre 2010).

Supporto finanziario

La ricerca è stata condotta come parte di un progetto di ricerca finanziato dal Ministero della salute.

14. European Food Safety Authority (EFSA) 2009. The Community summary report on food-borne outbreaks in the European Union in 2007, 30 April 2009. EFSA, Parma, 2 pp (www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/s271r.pdf ultimo accesso 15 dicembre 2010).
15. Fugett E.B., Schoonmaker-Bopp D., Dumas N.B., Corby J. & Wiedmann M. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched *Listeria monocytogenes* isolates from human clinical cases, foods, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE types. *J Clin Microbiol*, **45** (3), 865-873.
16. Gianfranceschi M.V., D'Ottavio M.C., Gattuso A., Bella A. & Aureli P. 2009. Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002-2005). *Food Microbiol*, **26**, 520-526.
17. Grothues D. & Tümmeler B. 1991. New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis: application to the analysis of *Pseudomonas* species. *Mol Microbiol*, **5**, 2763-2776.
18. Heir E., Lindstedt B.-A., Røtterud O.-J., Vardund T., Kapperud G. & Nesbakken T. 2004. Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. *Int J Food Microbiol*, **96**, 85-96.
19. Kabuki D.Y., Kuaye A.Y., Wiedmann M. & Boor J. 2004. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in Latin-style fresh cheese processing plants. *J Dairy Sci*, **87**, 2803-2812.
20. Kirby J., Bauer A.W., Sherris C. & Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, **45**, 493-496.
21. Latorre L., Parisi A., Fraccalvieri R., Normanno G., Nardella La Porta M.C., Goffredo E., Palazzo L., Ciccarese G., Addante N. & Santagada G. 2007. Low prevalence of *Listeria monocytogenes* in food from Italy. *J Food Prot*, **70** (6), 1507-1512.
22. Lomonaco S., Decastelli L., Numera D., Gallina S., Bianchi D.M., Civera T. 2009. *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: subtypes, diversity and persistence over time. *Int J Food Microbiol*, **123** (3), 516-520.
23. Prencipe V., Migliorati G., Matteucci O., Calistri P. & Di Giannatale E. 2010. Assessment of hygienic quality of some types of cheese sampled from retail outlets. *Vet Ital*, **46** (2), 233-242 (www.izs.it/vet_italiana/2010/46_2/233.htm ultimo accesso 15 dicembre 2010).
24. Progetto GOLIS 2004. Il formaggio Gorgonzola ed il problema *Listeria monocytogenes* (GOLIS). Quaderni della ricerca N°28, Regione Lombardia, Agricoltura, Gorgonzola, Conzorzio Tutela Formaggio Gorgonzola & Istituto Lattiero Caseario di Lodi, 44 pp (www.agricoltura.regione.lombardia.it/shared/ccurl/57/695/QdR%202028%20GOLIS.pdf ultimo accesso 15 dicembre 2010).
25. Thévenot D., Delignette-Muller M.L., Christieans S. & Vernozy-Rozand C. 2005. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *Int J Food Microbiol*, **102**, 85-94.
26. Tompkin R.B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J Food Prot*, **65** (4), 709-725.